



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DE LA ADIPOCINA SFRP5 EN EL DESARROLLO DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Roxana Guadalupe Gutiérrez Vidal

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Patricia Ostrosky Wegman
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. enero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Samuel Canizales Quinteros en la Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Samuel Canizales Quinteros	Facultad de Química, UNAM
Dra. Martha Patricia Ostrosky Wegman	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría de la Dra. Martha Patricia Ostrosky Wegman, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y del Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra, de la Facultad de Química, UNAM, para la realización de esta tesis.

Se reconoce la asesoría y colaboración del Dr. Rogelio Hernández Pando del Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, para la realización de este proyecto.

Se reconoce la colaboración del Dr. Francisco Campos Pérez, de la Clínica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Hospital General “Dr. Rubén Leñero”.

La alumna recibió una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante sus estudios de doctorado (Beca No. 207486).

Esta tesis fue apoyada por el Proyecto SALUD-2012-01-182801 de CONACYT y el proyecto PAPIIT-UNAM IA202413.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

PRESIDENTE

Dr. Rogelio Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

VOCAL

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Facultad de Medicina, UNAM

VOCAL

Dr. Julio Isael Pérez Carreón

Instituto Nacional de Medicina Genómica

VOCAL

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

SECRETARIO

Dr. Federico Martínez Montes

Facultad de Medicina, UNAM

A MI MADRE

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y el Posgrado en Ciencias Bioquímicas por darme la oportunidad de recibir una excelente educación.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por el apoyo, la enseñanza y su amistad que me brindó.

A los Dres. Patricia Ostrosky Wegman y Francisco Javier Plascencia de la Parra por su crítica constructiva y asesoría como miembros de mi comité tutor.

Al Dres. Rogelio Hernández Pando y Francisco Campos Pérez por su apoyo y asesoría para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado de examen de grado por su apoyo con la revisión de mi tesis.

Al programa de apoyo a los Estudios del Posgrado por el apoyo para asistir a los congresos: “XXXVI Congreso Nacional Genética Humana” y a la “Semana Nacional de Gastroenterología 2012” que fueron de gran utilidad para mi formación.

A Adriana por su invaluable apoyo, enseñanzas, consejos, comprensión y amistad.

A Laura, Hugo Antonio, Leslie, Miguel, Joel, Luis y Blanca por su ayuda, amistad y la agradable convivencia durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dres. Fausto Sánchez, Hugo Tovar y Soledad López por su valiosa asesoría.

A Leticia García por todo su valioso apoyo durante todo el Doctorado.

A mi padre y mis hermanos por su cariño, comprensión e incondicional apoyo.

A Alfredo por su amor, apoyo y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice de tablas	I
Índice de figuras	II
Resumen	1
Abstract	3
Abreviaturas	5
1. Antecedentes	7
1.1. Hígado graso no alcohólico (HGNA)	7
1.1.1. Definición y epidemiología	7
1.1.2. Diagnóstico	8
1.1.3. Patogenia	10
1.2. Participación de las adipocinas en el desarrollo del HGNA	14
1.3. Proteína secretada relacionada a Frizzled (SFRP5)	21
1.3.1. Sfrp5 como adipocina en modelos animales	21
1.3.2. SFRP5 en el humano	22
1.3.3. Mecanismo de acción de SFRP5 como adipocina	23
2. Planteamiento del problema	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo general	28
4.2. Objetivos particulares	28
5. Sujetos y métodos	30
5.1. Participantes del estudio	30
5.2. Mediciones antropométricas	32
5.3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales	32
5.4. Análisis histológico	33
5.5. Determinación del contenido hepático de triacilglicéridos	35

Contenido	Página
5.6 Extracción de mRNA y síntesis del cDNA de tejido hepático y adiposo	35
5.7 Cuantificación de la expresión de <i>SFRP5</i> , <i>WNT5A</i> y <i>ADIPOR2</i> mediante PCR tiempo real	36
5.8 Extracción de proteínas totales	37
5.9 Extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas	37
5.10 Cuantificación de las proteínas <i>SFRP5</i> y <i>WNT5A</i> mediante hibridación tipo western	38
5.11 Análisis de metilación del promotor de <i>SFRP5</i>	39
5.12 Inmunohistoquímica de <i>SFRP5</i> en el tejido hepático	40
5.13 Análisis estadístico	41
5.14 Análisis de expresión génica global en tejido hepático	42
5.14.1 Extracción del RNA para la expresión génica global por microarreglos	43
5.14.2 Análisis de expresión génica global mediante microarreglos	43
5.14.3 Análisis estadístico de los datos de expresión génica global	44
6. Resultados	46
6.1 Caracterización de la población de mujeres con obesidad clase II/III	46
6.2 Correlación entre las concentraciones séricas de <i>SFRP5</i> , adiponectina y leptina, y su relación con parámetros antropométricos y metabólicos	49
6.3 Asociación de las concentraciones circulantes de <i>SFRP5</i> , adiponectina y leptina con el HGNA y la fibrosis hepática	51

Contenido	Página
6.4 Expresión de <i>SFRP5</i> en tejido adiposo y hepático: asociación con el HGNA	56
6.4.1 Expresión de <i>SFRP5</i> en tejido adiposo y hepático	56
6.4.2 Correlación de la expresión hepática de <i>SFRP5</i> con parámetros antropométricos y bioquímicos	58
6.4.3 Asociación de la expresión hepática de <i>SFRP5</i> con el HGNA	60
6.4.4 Análisis de patrones de metilación del promotor de <i>SFRP5</i>	62
6.4.5 <i>SFRP5</i> como un factor de riesgo independiente para el HGNA	65
6.4.6 Asociación de la expresión hepática de <i>SFRP5</i> con la fibrosis hepática	65
6.4.7 Vía de señalización de WNT (WNT5A), posible relación entre <i>SFRP5</i> y el HGNA	66
6.4.8 Inmunolocalización de <i>SFRP5</i> en el tejido hepático	68
6.4.9 Análisis de expresión génica global mediante microarreglos en tejido hepático	70
7. Discusión	75
8. Conclusiones	88
9. Bibliografía	90
10. Artículo publicado	101

Índice de tablas

Tabla 1.	Descripción de las características histológicas empleadas en el sistema de puntuación semicuantitativo de Kleiner	34
Tabla 2.	Oligonucleótidos y sondas para la cuantificación de mRNA mediante PCR tiempo real	37
Tabla 3.	Secuencia de los oligonucleótidos empleados en MSP y HRM metilación	40
Tabla 4.	Parámetros antropométricos y bioquímicos de las mujeres del estudio	48
Tabla 5.	Correlación de las concentraciones séricas de SFRP5, adiponectina y leptina con parámetros antropométricos y bioquímicos	50
Tabla 6.	Correlación entre las concentraciones hepáticas de SFRP5 (mRNA y proteína) y parámetros antropométricos y bioquímicos	59
Tabla 7.	Análisis de regresión multivariado para predecir el puntaje de actividad del HGNA	65
Tabla 8.	Genes sub- y sobre-expresados en las mujeres del tercil 1 en comparación con las del tercil 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5	73
Tabla 9.	Análisis de enriquecimiento de vías de señalización y hepatotoxicidad de los genes diferencialmente expresados en las mujeres del tercil 1 en comparación con las del tercil 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5	74

Índice de figuras

Figura 1.	Representación esquemática de la patofisiología del HGNA	13
Figura 2.	Efecto de la leptina sobre la regulación del metabolismo de lípidos en el hígado	18
Figura 3.	Señalización de la adiponectina en el hígado	20
Figura 4.	Representación esquemática del posible mecanismo de acción de Sfrp5	25
Figura 5.	Frecuencia del HGNA en la población con obesidad clase II y III	46
Figura 6.	Concentraciones séricas de SFRP5 en mujeres y su asociación con el HGNA	51
Figura 7.	Relación de la acumulación de la grasa hepática con las concentraciones séricas de las adipocinas: adiponectina y leptina	53
Figura 8.	Distribución de las concentraciones séricas de adiponectina y leptina en mujeres con HGNA	54
Figura 9.	Expresión hepática del receptor <i>ADIPOR2</i> en el HGNA	55
Figura 10.	Asociación de las concentraciones séricas de SFRP5 con la fibrosis hepática	55
Figura 11.	Concentraciones séricas de adiponectina y leptina en la fibrosis hepática	56
Figura 12.	Expresión de <i>SFRP5</i> en tejido adiposo (visceral y subcutáneo) y hepático	57
Figura 13.	Correlación de la expresión hepática del mRNA y la proteína SFRP5 con la acumulación de grasa hepática	60
Figura 14.	Asociación de la expresión hepática del mRNA y	61

	la proteína SFRP5 con la acumulación de grasa hepática	
Figura 15.	Asociación de la expresión hepática del mRNA y la proteína SFRP5 con el HGNA	62
Figura 16.	Análisis de metilación de la región -326 a -191 pb del promotor <i>SFRP5</i> por PCR metilación específica en DNA de tejido hepático	63
Figura 17.	Análisis de metilación de la región -150 a -74 pb del promotor de <i>SFRP5</i> por HRM metilación	64
Figura 18.	Correlación de las concentraciones de SFRP5 y WNT5A en mujeres con obesidad II/III	67
Figura 19.	Asociación de las concentraciones séricas y hepáticas de WNT5A con el HGNA.	68
Figura 20.	Localización subcelular de SFRP5 en el tejido hepático sin HGNA y con EHNA.	69
Figura 21.	Gráfica de volcán de la expresión génica global entre las mujeres del tercil 1 y 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5	71

RESUMEN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una enfermedad que agrupa un amplio espectro de alteraciones hepáticas, que incluye desde la acumulación excesiva de grasa en el hígado (esteatosis) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los pacientes con HGNA frecuentemente presentan alteraciones en las concentraciones de diversas adipocinas, siendo la participación de la leptina y adiponectina la más estudiada, tanto como factores de riesgo como potenciales blancos terapéuticos para el HGNA. Dada la relevancia de las adipocinas en el desarrollo del HGNA, la búsqueda de nuevas adipocinas asociadas al HGNA es una tarea vigente. En este sentido, la proteína secretada relacionada a frizzled 5 (Sfrp5) fue identificada como una adipocina anti-inflamatoria con efecto protector contra el desarrollo de esteatosis hepática en un modelo murino de obesidad. Además, hallazgos en este mismo modelo sugieren que la regulación de la vía de Wnt mediante Sfrp5 podría estar involucrada en el desarrollo del HGNA. Sin embargo, la participación de SFRP5 en el desarrollo del HGNA han sido poco evaluada en humanos. Por ello, el objetivo del presente estudio fue analizar la participación de SFRP5 en el desarrollo y progresión del HGNA en mujeres mexicanas con obesidad.

El estudio comprendió 54 mujeres con obesidad clase II y III. La frecuencia del HGNA en esta población fue de 83.3%, de las cuales el 24.1% presentó esteatosis simple, el 18.5% EHNA indefinida y 40.7% presentó EHNA. El análisis de las concentraciones séricas de SFRP5 y leptina no mostró diferencias significativas entre los grupos sin HGNA, esteatosis y esteatohepatitis ($P > 0.05$). En contraste, los pacientes con esteatohepatitis presentaron concentraciones séricas de adiponectina menores comparadas con el grupo de mujeres obesas sin HGNA ($P < 0.05$). De manera interesante y a diferencia de lo observado con SFRP5 sérica, las concentraciones hepáticas de SFRP5 (mRNA y proteína) mostraron una correlación negativa con el contenido hepático de triacilglicéridos ($P = 0.039$) y fueron menores en las mujeres con esteatohepatitis en comparación con aquellas sin HGNA ($P = 0.026$ y $P = 0.006$, respectivamente). Aun cuando los resultados de

este estudio muestran que la disminución de los niveles hepáticos del mRNA de *SFRP5* no está relacionada con la metilación de las dos regiones (-326 a -191 pb y -150 a -74 pb) del promotor de *SFRP5*, no se puede excluir la participación de otras regiones. Además, a través del análisis de expresión génica global en biopsias de tejido hepático se identificó un perfil de expresión que involucra genes del estrés oxidante y de inflamación hepática asociado con la concentración de *SFRP5* en hígado, lo que podría estar relacionado con la segunda agresión para la progresión a esteatohepatitis.

En conclusión, este es el primer trabajo que reporta concentraciones hepáticas bajas de mensajero y proteína *SFRP5* asociadas con un riesgo mayor de esteatohepatitis en humanos.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises wide spectrum of liver disorders, ranging from excessive accumulation of fat in the liver (steatosis) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). NAFLD patients frequently show altered levels of several adipokines, including leptin and adiponectin, which are considered as risk factors and potentially as therapeutic targets. Because of the relevance of adipokines in the pathophysiology of NAFLD, the search for other adipokines involved in NAFLD is a current matter of extensive research. Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) was identified as an anti-inflammatory adipokine associated with lower hepatic lipid content in the murine model. In addition, findings in this model suggest that Wnt pathway regulation through Sfrp5 could be involved in the development of NAFLD. However, there is scarce evidence on the role of Sfrp5 in humans. The purpose of the present study was to analyze the role of SFRP5 in the development and progression of NAFLD in Mexican women with obesity.

The study included 54 women with class II and class III obesity. The prevalence of NAFLD in this group was 83.3%, 24.1% of these had simple steatosis, 18.5% had undefined NASH and 40.7% had NASH. Serum SFRP5 and leptin concentrations did not differ significantly among women without NAFLD, with steatosis and NASH ($P>0.05$). In contrast, patients with steatohepatitis showed higher serum adiponectin concentrations as compared to those without NAFLD ($P<0.05$). Interestingly, and unlike serum SFRP5 levels, hepatic SFRP5 expression levels (mRNA and protein) showed a negative correlation with hepatic triglyceride content ($P=0.039$), and SFRP5 expression levels were lower in women with steatohepatitis than in women without NAFLD ($P=0.026$ and $P=0.006$, respectively). Although decreased hepatic SFRP5 mRNA levels did not correlate with methylation of promoter regions -326 to -191 pb and -150 to -74 pb, methylation of other promoter regions could be responsible for this decreased expression. Moreover, global gene expression in hepatic tissue biopsies identified

an expression profile associated with SFRP5 hepatic concentrations, which involves oxidative stress and inflammation pathways, and could be related with the second hit of progression to steatohepatitis.

In conclusion, this is the first study reporting low hepatic SFRP5 mRNA and protein concentrations associated with a higher risk of steatohepatitis in humans.

ABREVIATURAS

ACTB	Beta actina
ADIPOR2	Receptor 2 de adiponectina
AGLs	Ácidos grasos
ALT	Alanino aminotransferasa
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AST	Aspartato aminotransferasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
GGT	Gama glutamil transpeptidasa
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HLD-C	Colesterol de lipoproteína de alta densidad
HOMA-IR	Modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina
HRM	Alta resolución por punto de melting (apareamiento)
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
LDL-C	Colesterol de lipoproteína de bajo peso molecular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSP	Reacción en cadena de la polimerasa metilación específica
NAS	Puntaje de actividad del HGNA
NRF2	Factor nuclear respiratorio 2
PCR tiempo real	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
PPAR- γ	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas gama
PPAR- α	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa
PXR	Receptor nuclear X de pregnano
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor nuclear X retinoide
SFRP5	Proteína secretada relacionada a frizzled 5
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de alta densidad
Wnt	Wingless
WNT5A	Miembro 5a de la familia del sitio de integración MMTV tipo wingless

1. ANTECEDENTES

1.1. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA)

1.1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una enfermedad hepática crónica caracterizada por la acumulación de grasa, principalmente en forma de triacilglicéridos, mayor al 5% del peso total del hígado o el 5% de los hepatocitos [1].

El HGNA inicia como una simple esteatosis (exceso de grasa), aunque puede progresar a una forma más severa conocida como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) [1]. Ésta se caracteriza por esteatosis, infiltrado inflamatorio y daño hepatocelular (balonamiento hepático), e incrementa el riesgo de desarrollar fibrosis y, eventualmente, cirrosis [2,3].

Como su nombre lo indica, el HGNA se presenta en personas que no ingieren alcohol, o bien, su consumo está considerado como no hepatotóxico (<20 g de alcohol/día) [4]. La frecuencia del HGNA aumenta de manera considerable conforme incrementa la obesidad [1,5,6]. Diversos estudios muestran que el HGNA está presente hasta en un 80% de los sujetos con obesidad clase I/II y hasta en un 95% de los sujetos con obesidad clase III [7–10]. Además, estudios

multiétnicos realizados en habitantes de Estados Unidos estiman que la prevalencia del HGNA es mayor en la población hispana (45%; principalmente méxico-americana), en comparación con la población caucásica (33%) y afroamericana (24%) [11,12]. Esta diferencia se relaciona con una acumulación mayor de grasa visceral en los sujetos de origen hispano [11].

En la población general, estudios transversales en distintas poblaciones han reportado una frecuencia de HGNA de 20 a 30% [1,2,13] y en México, de alrededor del 17% [14]. No obstante, se desconoce su prevalencia a nivel mundial debido a la falta de un método de diagnóstico preciso y no invasivo.

1.1.2. *DIAGNÓSTICO*

A la fecha, el análisis histológico en biopsia hepática es considerado como el método más fiable para el diagnóstico de las diversas etapas del HGNA (esteatosis y esteatohepatitis) y fibrosis [15]. La biopsia hepática se realiza: 1) para determinar la presencia de esteatohepatitis en pacientes con elevación crónica sin causa aparente de la actividad de las transaminasas; 2) cuando existe una fuerte sospecha de fibrosis hepática; y 3) en pacientes sometidos a cirugía bariátrica [16,17]. En estos últimos, la finalidad es identificar la EHNA y, de estar presente, tratarla de manera temprana para disminuir la progresión de la enfermedad [18].

Debido a lo anterior, se han diseñado algunos métodos de diagnóstico no invasivos como la determinación de marcadores séricos, índices o puntajes y estudios de imagenología.

La elevación crónica de la actividad de las enzimas de funcionamiento hepático: aspartato aminotransferasa ($AST > 40$ UI/L), alanina aminotransferasa ($ALT > 40$ UI/L) y gamma glutamil transferasa ($GGT \geq 48$ UI/L en hombres y $GGT \geq 29$ UI/L en mujeres) son marcadores séricos que sugieren daño hepático, incluido el ocasionado por el HGNA. Sin embargo, estos marcadores tienen baja sensibilidad y especificidad [19].

Por otro lado, se han diseñado una gran variedad de puntajes (i.e. algoritmos matemáticos) para estimar la presencia de esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis. Para el cálculo de estos puntajes se consideran parámetros antropométricos (talla, peso y circunferencia de cintura), determinaciones bioquímicas como glucosa en ayuno, triacilglicéridos, colesterol total y la actividad enzimática de ALT, AST y GGT. Una vez calculados, los puntajes se ajustan por edad y género [16]. Un ejemplo de estos puntajes es el Fibromax, el cual se basa en determinaciones séricas de bilirrubina total, GGT, ALT, haptoglobina, apolipoproteína A-I, $\alpha 2$ -macroglobulina, AST, glucosa en ayuno, colesterol total y triacilglicéridos; ajustando el resultado por edad, sexo, peso y talla [20].

Adicionalmente, estudios de imagenología como el ultrasonido, la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear, han sido de utilidad para determinar la acumulación de grasa en el hígado con mayor precisión que los marcadores de actividad enzimática o los puntajes [1,2].

No obstante, estos tres tipos de métodos no detectan el infiltrado inflamatorio y daño hepático con la especificidad y sensibilidad de la evaluación histológica de la biopsia hepática. Por lo tanto, se siguen buscando marcadores no invasivos que permitan un diagnóstico preciso de la enfermedad.

1.1.3. PATOGENIA

Day y James (1998) propusieron la hipótesis de “Dos agresiones” con la finalidad de establecer los mecanismos de patogenia del HGNA, los cuales aún no han sido completamente dilucidados [6]. La “Primera agresión” corresponde al desarrollo de la esteatosis y la “Segunda agresión” a la de la esteatohepatitis.

Los mecanismos principales involucrados en este proceso incluyen el estrés oxidante, disfunción mitocondrial y un perfil alterado de secreción de adipocinas (Figura 1).

ESTEATOSIS HEPÁTICA

En la “Primera agresión”, la acumulación de grasa hepática se debe a un desequilibrio en el metabolismo de lípidos aunado al de los carbohidratos. Este desequilibrio se traduce en un influjo mayor de lípidos al hígado acompañado de un eflujo menor de éstos [21,22]. El incremento del influjo de ácidos grasos libres (AGLs) se debe principalmente a una alta actividad lipolítica del tejido adiposo y, en menor grado, a una síntesis de *novo* aumentada de AGLs en el hígado y un consumo abundante de grasas en la dieta [23]. Por otro lado, la remoción de estos lípidos (eflujo) mediada por β -oxidación y la secreción de lipoproteínas de alta densidad (VLDL) puede ser normal o estar incrementada. Sin embargo, el aumento en la actividad de estas vías no es suficiente para disminuir la concentración hepática de AGLs y triacilglicéridos [24].

El desequilibrio metabólico de lípidos está acompañado comúnmente de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, como la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina [1,25]. La hiperinsulinemia es consecuencia de la disminución de la sensibilidad (resistencia) a la insulina, la cual coexiste de manera frecuente con la esteatosis [25]. La resistencia a la insulina, i.e. la interrupción de la señalización de esta hormona, resulta en la falta de inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo [26]. Además, la resistencia a la insulina incrementa la gluconeogénesis y la activación de vías de biosíntesis de lípidos en el hígado que resulta en la producción aumentada de VLDL y dislipidemia [27]. Por lo tanto,

la resistencia a la insulina se considera como un factor de riesgo para la acumulación de grasa hepática. Sin embargo, cabe destacar que ésta no es la única vía que participa en la patogenia del HGNA, ya que la población afroamericana exhibe una frecuencia elevada de resistencia a la insulina pero baja de HGNA [11]. Esto sugiere que existen varias rutas que conducen al desarrollo de esta enfermedad.

PROGRESIÓN A ESTEATOHEPATITIS

En la “Segunda agresión”, el estrés del retículo endoplasmático, el estrés oxidante, además de un perfil alterado de secreción de adipocinas, conllevan a la inflamación y al daño hepatocelular característicos de la EHNA (Figura 1) [1,22].

El estrés del retículo endoplasmático activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR: unfolded protein response) y éstas a su vez, vías de señalización mediadas por IRE (inositol requiring 1- α), PERK (PKR-like ER kinase) y ATF (activating transcription factor) [28]. La activación de estas vías induce la expresión de genes involucrados en la resolución del estrés del retículo endoplasmático [28]. Sin embargo, su activación crónica induce la infiltración inflamatoria, altera la vía de señalización de la insulina e incrementa la lipogénesis y el estrés oxidante, lo que contribuye al establecimiento de la EHNA [29].

Por otro lado, la acumulación de lípidos en el hepatocito altera la capacidad de oxidación de la mitocondria [30], ocasionando estrés oxidante. Esto se refleja en una producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS) aunada a una disminución de enzimas antioxidantes. El estrés oxidante induce la muerte celular y promueve la producción de citocinas inflamatorias, favoreciendo la progresión a esteatohepatitis [30,31].

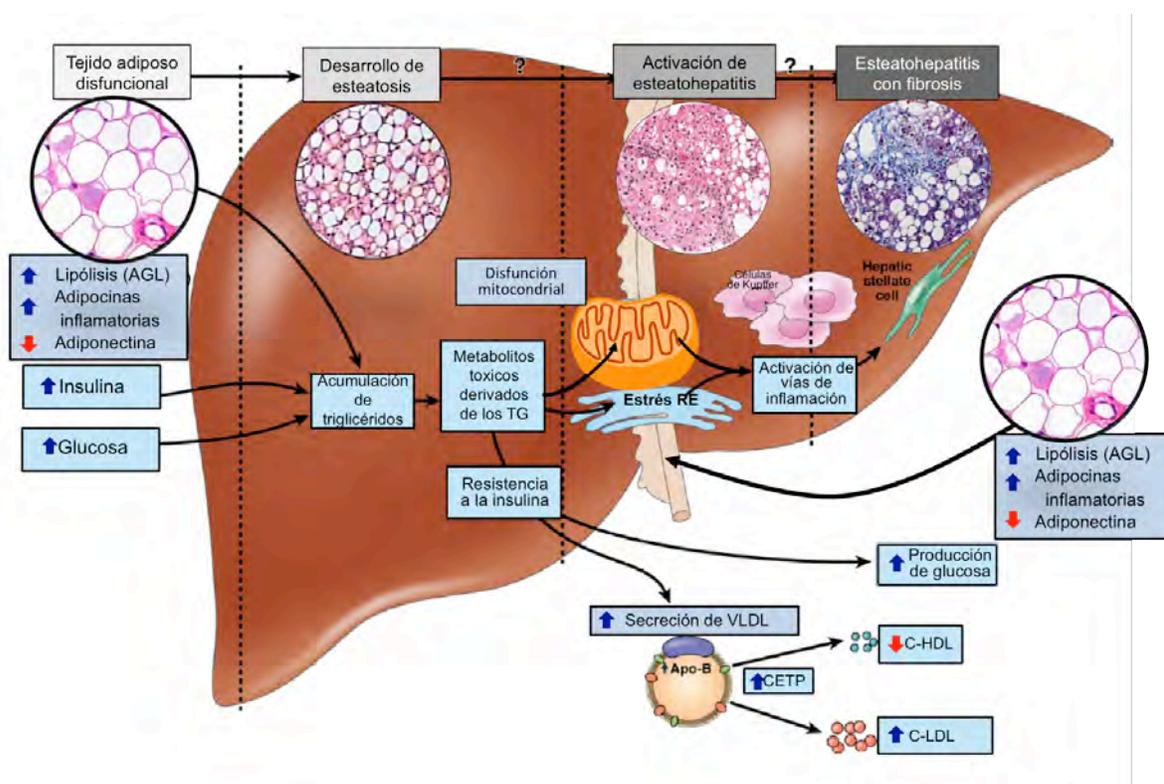


Figura 1. Representación esquemática de la patofisiología del HGA. La “Primera agresión” describe la acumulación ectópica de grasa en el hígado, ocasionada por un incremento en la lipólisis del tejido adiposo, así como una secreción aumentada de adipocinas pro-inflamatorias y disminuida de anti-inflamatorias en presencia de hiperinsulinemia y concentración elevada de glucosa. Posteriormente, puede ocurrir una “Segunda agresión”, la cual comprende la lipotoxicidad de los derivados de los lípidos como TG y la resistencia a la insulina, las cuales favorecen la disfunción mitocondrial y el estrés del retículo endoplasmático, aunado a la secreción alterada de adipocinas por parte del tejido adiposo. Abreviaturas: AGLs, ácidos grasos libres; TG, triacilglicéridos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; C-HDL, colesterol de lipoproteína de alta densidad; C-LDL, lipoproteína de baja densidad; CEPT, proteína transportadora de ésteres de colesterol; RE, retículo endoplasmático. Modificada Cusi K [32].

PROGRESIÓN DE ESTEATOHEPATITIS A FIBROSIS

La fibrosis es una respuesta cicatrizal del hígado para revertir el daño y así mantener la estructura y funcionalidad del órgano. Sin embargo, el daño crónico producido por la EHNA puede favorecer el establecimiento de la fibrosis a través de una producción excesiva de proteínas de la matriz extracelular y la disminución de su degradación [33]. Ésto puede provocar el desarrollo de cirrosis, etapa final de la fibrosis en la que se presentan nódulos parenquimatosos rodeados por cicatrices, los cuales hacen disfuncional al hígado [34].

Estudios transversales han reportado del 9 al 15% de los pacientes con EHNA progresan a fibrosis y cirrosis [2,3] y en población con obesidad mórbida se presenta una prevalencia promedio de fibrosis de 34% (13 – 74%) en sujetos con EHNA [7,35,36].

1.2. PARTICIPACIÓN DE LAS ADIPOCINAS EN EL DESARROLLO DEL HGNA

Debido a que la obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del HGNA [2,5,37], varios estudios epidemiológicos y en modelos animales se han enfocado en estudiar la implicación del tejido adiposo en esta

patología, principalmente la contribución de la secreción alterada de algunas adipocinas [2,5,37].

Durante la obesidad, el tejido adiposo es excesivo y disfuncional, i.e. los adipocitos (que normalmente almacenan triacilglicéridos) tienen una lipólisis elevada y, como consecuencia, la concentración de AGLs en la circulación sistémica está incrementada. Cabe señalar que el hígado está expuesto a una mayor concentración de AGLs con respecto a otros órganos debido a que el tejido adiposo libera AGLs de manera directa en la vena porta [38–40], lo cual promueve la síntesis hepática de lípidos, lipoproteínas y glucosa [41].

Aunado a lo anterior, el tejido adiposo exhibe una secreción alterada de adipocinas. Estas proteínas son sintetizadas y secretadas por los adipocitos a la circulación sistémica y actúan en órganos como el hígado y el músculo a través de su unión a receptores de membrana. Esto activa vías de señalización que regulan funciones como el gasto energético, procesos inflamatorios y el metabolismo de lípidos y glucosa [42,43].

El perfil alterado de secreción de adipocinas se caracteriza por un incremento en la síntesis y secreción de adipocinas pro-inflamatorias como leptina, resistina, TNF- α (Factor de necrosis tumoral α) e IL-6 (interleucina 6) y una secreción reducida de la adipocina anti-inflamatoria, adiponectina [44,45];

promoviendo un estado inflamatorio [46–48], resistencia a la insulina, influjo mayor de AGLs al hígado, producción de ROS y apoptosis en distintos tejidos [49–54].

Múltiples estudios transversales han reportado que sujetos con HGNA exhiben concentraciones séricas incrementadas de leptina, resistina, TNF- α e IL-6, pero disminuidas de adiponectina, en comparación con sujetos sin HGNA [45,47,50,53,55–57]. Este comportamiento correlaciona positivamente con inflamación y fibrosis hepática [48,55,58]. Sin embargo, es importante mencionar que estos hallazgos no han sido consistentes en distintos estudios en el humano, debido probablemente a diferencias metodológicas y en los criterios utilizados para el diagnóstico histológico del HGNA [45,55,59–61].

La cuantificación de la concentración sérica de adipocinas está considerada como una herramienta útil para identificar el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. Por ejemplo, se ha propuesto el cociente leptina/adiponectina como marcador de resistencia a la insulina debido a que correlaciona negativamente con el índice de sensibilidad a la insulina medido por pinza euglicémica hiperinsulinémica [62]. Además, se ha propuesto que las concentraciones séricas elevadas de leptina y bajas de adiponectina podrían ser utilizadas como marcadores de diagnóstico no invasivos del HGNA [55,64–67].

La leptina es una adipocina pro-inflamatoria que ejerce sus efectos a través de la unión al receptor LepRb expresado en el hipotálamo y tejidos periféricos, e.g.

hepático y adiposo [68]. En el hipotálamo, la leptina regula la homeostasis energética, incrementado el gasto energético y disminuyendo el apetito [69]. Además, esta hormona regula de manera indirecta en el hipotálamo y directa en el hígado, el metabolismo de lípidos mediante la activación de la β -oxidación [69].

Aun cuando los sujetos con obesidad e/o HGNA presentan frecuentemente hiperleptinemia, la acción de de esta hormona es deficiente. Esta condición es conocida como resistencia a la leptina y puede deberse a un transporte defectuoso de la adipocina a través de la barrera hematoencefálica, la disminución de su señalización o presencia de variantes genéticas en *LEP* y *LEPR* [70–72] (Figura 2). En contraste, los efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos de la leptina no están inhibidos, sugiriendo que la resistencia a esta adipocina es sólo parcial en sus tejidos blanco [73].

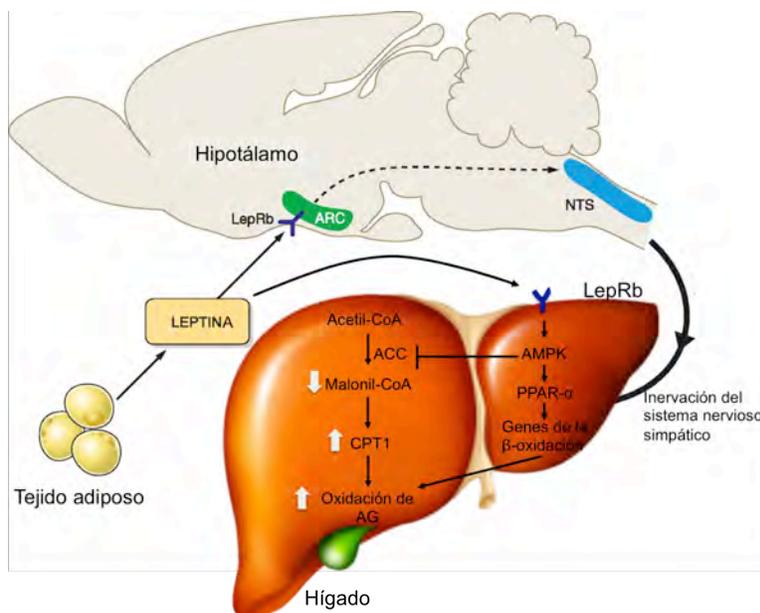


Figura 2. Efecto de la leptina sobre la regulación del metabolismo de lípidos en el hígado. La leptina regula el metabolismo hepático de lípidos mediante su unión al receptor LepRb directamente en el hígado, o indirectamente, en el hipotálamo. Esto activa la vía de señalización de AMPK en el hígado, lo cual bloquea a ACC1, inhibiendo así, la producción de malonil-CoA y, por lo tanto, la síntesis de novo de AGLs. En condiciones de concentraciones bajas de malonil-CoA, CPT-1 puede transportar AGLs a la mitocondria para su oxidación, lo cual favorece una menor acumulación de AGLs en el HGNA. Adicionalmente, AMPK promueve la síntesis de PPAR α , el cual estimula la síntesis de genes involucrados en la β -oxidación. Abreviaturas: AMPK, Proteína cinasa activada por AMP ; ACC, Acetil-CoA carboxilasa; CPT-1, carnitina palmitoiltransferasa 1. Modificada de Morton GJ y Schwartz MW [74] y Minokoshi y cols [75].

La adiponectina producida y secretada como trímero, hexámero y multímero de alto peso molecular, tiene efectos de tipo anti-inflamatorio, anti-esteatótico, anti-oxidante y anti-fibrótico, además de favorecer la sensibilidad a la insulina [76].

Esta adipocina ejerce su acción biológica a través de dos receptores: ADIPOR1, expresado predominantemente en el músculo y ADIPOR2, en el hígado. La unión a sus receptores promueve la activación de APPL1 (proteína adaptadora con dominio PH, PTB y motivo de cremallera de leucina 1), la cual activa a su vez a AMPK (proteína cinasa por AMP), PPAR- α (receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa), PPAR- γ (receptor activado por el proliferador de

peroxisomas gama) y p38MAPK (proteína cinasa activada por mitogenos p38) (Figura 3) [76,77].

La capacidad anti-inflamatoria de la adiponectina se debe a que ésta altera el funcionamiento de los macrófagos, bloqueando su actividad fagocítica [78,79]; además de disminuir la producción y respuesta inflamatoria de TNF- α [80].

En el hígado, la adiponectina reduce la gluconeogénesis hepática, incrementa la β -oxidación de AGLs y disminuye la síntesis *de novo* de ácidos grasos vía AMPK [77]. Los efectos anti-fibróticos de la adiponectina consisten en la disminución de la producción de mediadores inflamatorios y la activación de las células hepáticas esteladas [81]. Debido a estos efectos protectores, se ha sugerido que la adiponectina puede ser utilizada en el tratamiento del HGNA [63].

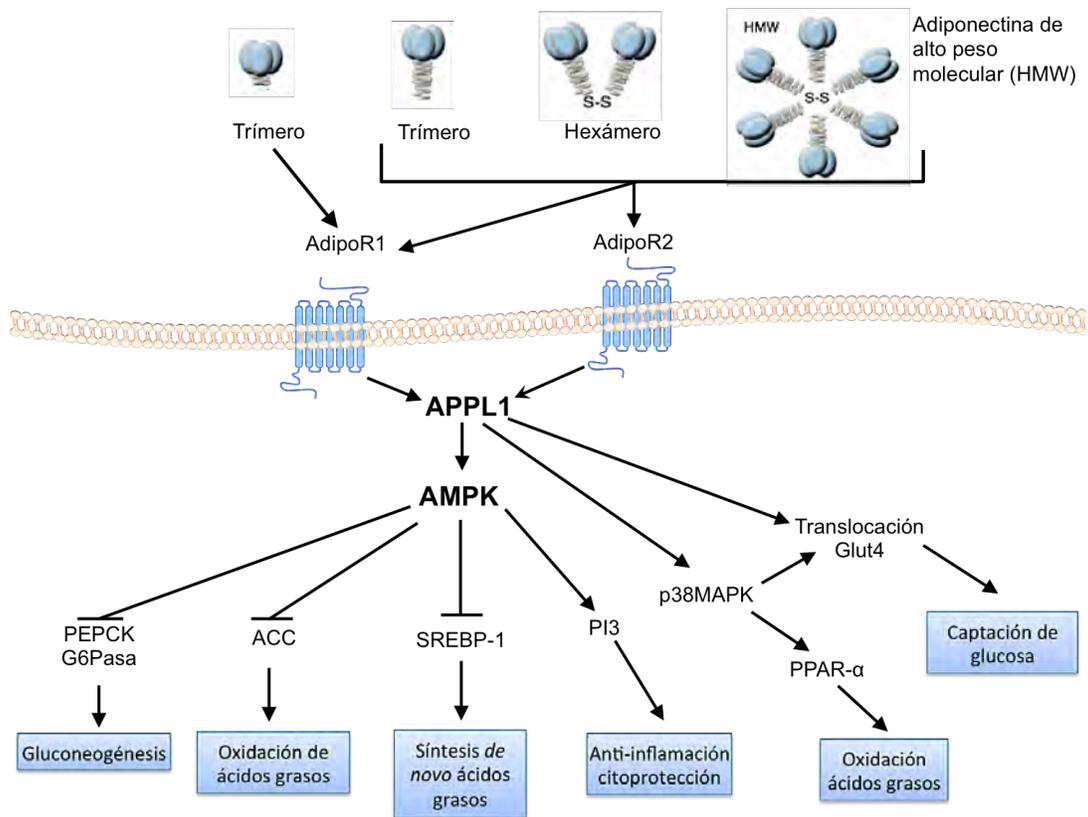


Figura 3. Señalización de la adiponectina en el hígado. La adiponectina es sintetizada y ensamblada en el tejido adiposo subcutáneo en tres multímeros: trímeros, hexámeros y adiponectina de alto peso molecular. Esta adipocina es secretada a la circulación sistémica y se une a dos receptores en sus órganos blanco: ADIPOR1 y ADIPOR2. La unión a sus receptores activa a la molécula APPL1, y esta a su vez, a AMPK, la cual inhibe la gluconeogénesis (PEPCK y G6Pasa) y la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (SREBP-1). Además, AMPK favorece la oxidación de ácidos grasos mediante la inhibición de ACC y activación de PPAR- α , promueve un menor estado inflamatorio (PI3 y NF- κ B) y estimula la captación de glucosa (GLUT-4). Abreviaturas: APPL1, proteína adaptadora con dominio PH, PTB y motivo de cremallera de leucina 1; ACC, acetil-CoA carboxilasa; SREBP-1, proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides; PI3, fosfoinositol 3-cinasa; PPAR- α , receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa; GLUT4, transportador de glucosa-4 Modificada de Brochu-Gaudreau y cols [76].

Actualmente, la adiponectina es la única adipocina descrita como protectora contra el HGNA en humanos. Sin embargo, estudios *in vitro* y en animales han identificado otra adipocina que también podría tener un efecto protector contra el hígado graso [43,55,82], conocida como proteína secretada relacionada a Frizzled 5 (SFRP5) [83].

1.3. PROTEÍNA SECRETADA RELACIONADA A FRIZZLED 5 (SFRP5)

1.3.1. *Sfrp5* COMO ADIPOCINA EN MODELOS ANIMALES

Ouchi y cols. (2010) mostraron que la expresión génica de *Sfrp5* en el tejido adiposo de ratones obesos (modelo de obesidad genética o inducida por dieta) es menor a la observada en ratones delgados. Además, los ratones deficientes de SFRP5 alimentados con una dieta obesogénica presentan una mayor ganancia de peso, esteatosis hepática e intolerancia a la glucosa con respecto a los de tipo silvestre. Adicionalmente, la restitución de *Sfrp5* revirtió la esteatosis hepática, la intolerancia a la glucosa, y disminuyó la expresión de las adipocinas pro-inflamatorias *Il-6*, *Tnf- α* y *proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1)*. Cabe destacar que la administración de un vector con *Sfrp5* en ratones con esteatosis hepática inducida genéticamente revirtió esta condición con mayor eficiencia que la del vector con adiponectina [83]. Con base en estos resultados, se sugirió a *Sfrp5* como una adipocina anti-esteatótica y anti-inflamatoria, la cual participa en la patogenia de la esteatosis hepática y la intolerancia a la glucosa en modelos murinos de obesidad. Sin embargo, la participación de SFRP5 en estas alteraciones metabólicas ha sido poco estudiada en humanos.

1.3.2. SFRP5 EN EL HUMANO

Varios estudios han reportado una correlación negativa de las concentraciones séricas de SFRP5 con el IMC (índice de masa corporal), las concentraciones séricas de triacilglicéridos y colesterol, y una correlación positiva con C-HDL (colesterol de lipoproteína de alta densidad) [84–86], sugiriendo un efecto protector de SFRP5 contra alteraciones metabólicas en el humano.

De igual manera, estudios recientes en humanos mostraron que las concentraciones séricas de SFRP5 correlacionan positivamente con las de adiponectina y negativamente con las de leptina y el cociente leptina/adiponectina (marcador de resistencia a la insulina) [81,94,96]. Estos hallazgos son consistentes a lo observado en el modelo de ratón, además sugieren que en el humano, SFRP5 podría ser considerada como una adipocina anti-inflamatoria semejante a la adiponectina.

La expresión génica de *SFRP5* es abundante en epitelio pigmentario de la retina y páncreas, y es menor en otros tejidos como colón e hígado del humano [87], a diferencia de lo observado en el modelo murino, donde *Sfrp5* se expresa únicamente el tejido adiposo [83]. De manera consistente, se ha observado expresión de *SFRP5* baja en el tejido adiposo humano (subcutáneo y visceral) , la cual se debe a expresión en la fracción estromal y no en el adipocito [88].

1.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE SFRP5 COMO ADIPOCINA

El estudio de los mecanismos mediante los cuales se desarrolla y progresa el HGNA es crucial para identificar blancos terapéuticos que permitan mejorar su tratamiento e incluso prevenir y curar esta enfermedad.

En este sentido, se sabe que SFRP5 pertenece a una familia de 5 miembros denominada “proteínas secretadas relacionadas a frizzled” [89]. El gen *SFRP5* está compuesto por 1,883 pares de bases (pb), tiene 3 exones y codifica para una proteína de 317 aminoácidos. La región amino terminal presenta un dominio homólogo al dominio extracelular de los Frizzled, conformado principalmente por cisteínas (cysteine-rich domain; CRD), mientras que la región carboxilo terminal tiene un motivo relacionado a netrina (NTR) [90].

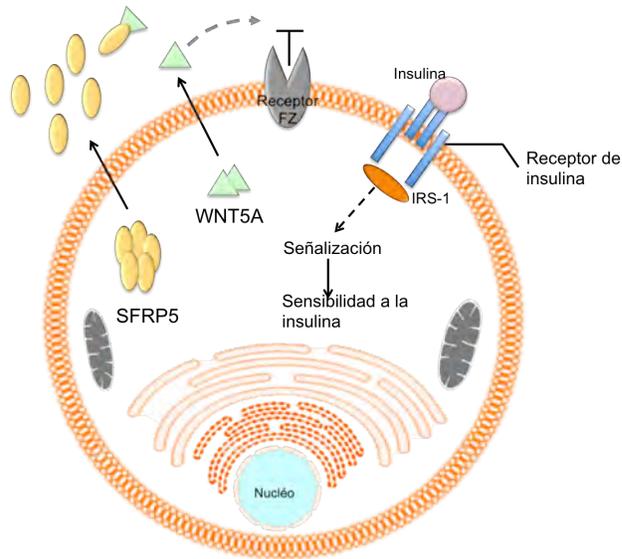
Se ha establecido que el mecanismo de acción de SFRP5 consiste en su unión a los ligandos WNT5A y WNT11 (a través del dominio CRD), evitando que estos se unan a sus receptores Frizzled para modular la vía de Wingless (WNT) en los tejidos blanco [91]. La vía de señalización de WNT es esencial en el desarrollo embrionario. Además, en la vida adulta está implicada en el funcionamiento de diversos tejidos [92,93]. En el hígado, esta vía participa en el crecimiento, regeneración, metabolismo y estrés oxidante [94]. De manera consistente, la presencia de mutaciones y/o el silenciamiento epigenético en componentes de la vía WNT pueden causar condiciones patológicas, como

distintos tipos de cáncer [95]. Estudios epigenéticos han identificado que la expresión génica de *SFRP5* está silenciada por hipermetilación en la región comprendida de -326 a -191 pb en su promotor. Esto provoca una proliferación celular descontrolada que conlleva al desarrollo de cáncer, incluido el carcinoma hepatocelular [87,92,93]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual *SFRP5* participa como adipocina en el desarrollo de la esteatosis hepática e intolerancia a la glucosa.

Ouchi y cols. propusieron que *Sfrp5* puede regular el metabolismo de lípidos y glucosa en el modelo de ratón mediante su unión a *Wnt5a*. Los autores señalaron que el adipocito del ratón delgado secreta una alta proporción de *Sfrp5* que permite neutralizar a todas las moléculas de *Wnt5a* circulantes, evitando la unión de esta última a su receptor y la subsecuente activación de la vía de *Wnt* (Figura 4a). En contraste, la proporción *Sfrp5/Wnt5a* secretada se invierte en el adipocito del ratón obeso, lo que conlleva a que *Sfrp5* sea incapaz de neutralizar a todas las moléculas de *Wnt5a*. Por lo tanto, *Wnt5a* se une a su receptor *FrZ* (*frizzled*), activando la vía no canónica de *Wnt*. Esta inducción produce la activación de *Jnk-1* (cinasa c-Jun N-terminal), el cual fosforila residuos de serina del sustrato del receptor de insulina 1, inhibiendo la señalización de la insulina (Figura 4b) [83,96].

En consistencia con este hallazgo, otros estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado la participación de *Wnt5a* en el desarrollo del hígado graso a través de la activación de *Jnk*, la cual estimula respuestas inflamatorias [97].

(a) Adipocito de un ratón delgado



(b) Adipocito de un ratón obeso

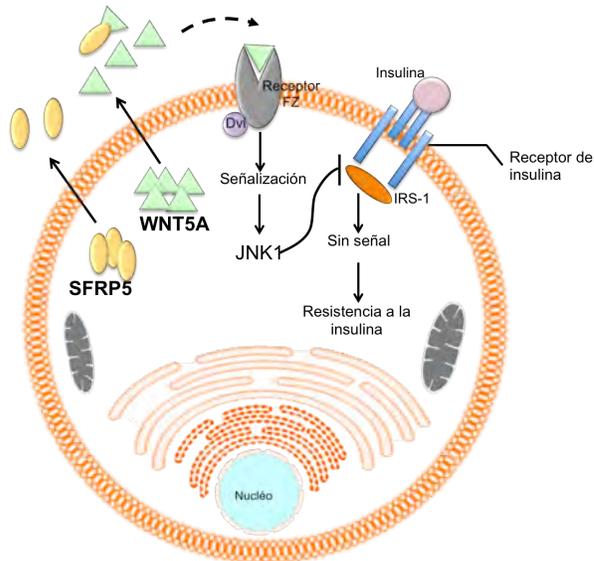


Figura 4. Representación esquemática del posible mecanismo de acción de Sfrp5. (a) En un adipocito de un ratón delgado, Sfrp5 se encuentra en mayor proporción que Wnt5a y, por lo tanto, no se activa la vía no canónica de Wnt; (b) En contraste, en un adipocito de un ratón obeso, Sfrp5 está en menor proporción que Wnt5a y, por lo tanto, la unión de Wnt5a con su receptor no es bloqueada. Al unirse a su receptor, Wnt5a activa la vía no canónica de Wnt, activando a Jnk1 y, posteriormente, promoviendo la resistencia a la insulina al fosforilar residuos de Ser del sustrato del receptor de la insulina 1(Irs-1). Modificada de Ouchi y cols. [83].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El HGNA es una enfermedad hepática crónica que ha tomado gran importancia en los últimos años, debido en parte, al incremento de la prevalencia de la obesidad. La patogenia del HGNA aún no está completamente dilucidada. Sus mecanismos, incluido el perfil alterado de secreción de adipocinas, siguen siendo investigados con la finalidad de optimizar su tratamiento y, eventualmente, prevenir y curar esta patología. Los modelos animales de HGNA o EHNA han sido de gran importancia para identificar moléculas asociadas a esta enfermedad, pero estos no reflejan por completo la patofisiología del HGNA en el humano. Recientemente, Sfrp5 se identificó como una adipocina anti-inflamatoria con propiedades anti-esteatóticas en un modelo murino de obesidad. Sin embargo, su participación en el desarrollo del HGNA en el humano ha sido poco estudiada. Por lo tanto, el presente estudio evaluó la asociación de SFRP5 con el HGNA en mujeres mexicanas con obesidad, su correlación con WNT5A y si las concentraciones hepáticas de SFRP5 se asociaron con un perfil de expresión génica relacionado con el funcionamiento del tejido hepático.

3. HIPÓTESIS

Las concentraciones de SFRP5 séricas y de tejido adiposo y hepático están disminuidas en mujeres obesas con HGNA; y correlacionan negativamente con las concentraciones de WNT5A en estos tejidos.

La disminución de la expresión de *SFRP5* se debe, en parte, a la metilación de su promotor, y afecta la expresión hepática de genes implicados en vías de señalización asociadas con el desarrollo del HGNA.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación de las concentraciones de SFRP5 en suero, tejido hepático y adiposo, con la presencia del HGNA en mujeres con obesidad. Además, analizar si estas concentraciones se asocian con las concentraciones de WNT5A y con un perfil de expresión génica hepática relacionado con el desarrollo del HGNA.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Replicar las asociaciones previamente reportadas para las concentraciones séricas de adiponectina y leptina con el HGNA, en las mujeres con obesidad participantes en este estudio.
- Evaluar si la expresión hepática del receptor 2 de adiponectina (*ADIPOR2*) se asocia con el HGNA.
- Analizar la correlación de las concentraciones séricas y de expresión en tejido adiposo y hepático de SFRP5 con las concentraciones de WNT5A, así como su asociación con el HGNA.

- Analizar los patrones de metilación de las regiones -326 a -191 pb y de -150 a -74 pb del promotor de *SFRP5* y su asociación con la expresión de este gen.
- Identificar perfiles de expresión génica asociados con hepática de la proteína SFRP5, a través de análisis de expresión génica global.

5. SUJETOS Y MÉTODOS

5.1. Participantes del estudio

Se realizó un estudio de corte transversal en el que participaron 54 mujeres con obesidad clase II/III sometidas a cirugía bariátrica para reducción de peso corporal en el Hospital General “Dr. Rubén Leñero” de la Ciudad de México. La razón por la cual el estudio comprendió solo mujeres se debe a que éstas recurren más frecuentemente a este tratamiento quirúrgico y tienen mayor disponibilidad de participar en este tipo de estudios. Además, el número de hombres sin HGNA participantes en el estudio fue escaso (n=2), lo que imposibilita el análisis estratificado por sexo.

Las mujeres candidatas para la cirugía bariátrica fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: aquellas con obesidad clase III (IMC igual o mayor a 40 kg/m²) y con obesidad clase II (IMC de 35 a 39.9 kg/m²) [98] que presentaran una o más comorbilidades como diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión (presión arterial sistólica \geq 140 mmHg o presión arterial diastólica \geq 90 mmHg o tratamiento para la hipertensión), o concentración sérica de triacilglicéridos \geq 150 mg/dL o de C-HDL \leq 50 mg/dL [99,100]. El rango de edad fue de 21-60 años. A todas las participantes se les tomó una biopsia de tejido hepático y adiposo (subcutáneo y visceral) durante la cirugía. Durante un periodo de un año y medio,

se captaron 68 mujeres de manera consecutiva, de las cuales 54 cumplieron con los criterios de inclusión. Todas las participantes en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres con obesidad clase II o III sometidas a cirugía bariátrica, como tratamiento para disminución del peso corporal.
- Mayores de 18 años de edad.
- Contar con biopsia transoperatoria de tejido hepático y tejido adiposo (visceral y subcutáneo).
- Consentimiento informado firmado por la participante.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres con historial de consumo de alcohol ≥ 20 g/ día.
- Mujeres con historia de hepatitis viral o marcadores serológicos positivos para hepatitis viral B o C (antígeno de superficie de la hepatitis B o anticuerpo contra el virus de la hepatitis C).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Las participantes sin biopsia hepática o de tejido adiposo.
- Mujeres que no firmaron el consentimiento informado.

El tamaño de la muestra se obtuvo con el programa G*Power (Heinrich-Heine-Universität) [101]. Para ello, se calculó el poder estadístico con base en estudios previos de asociación de adiponectina con el HGNA en población con obesidad mórbida [67,102], suponiendo que SFRP5 tiene un efecto semejante al de adiponectina. El tamaño de la muestra calculado fue de 16 sujetos por grupo, considerando un efecto de 0.43, un poder estadístico de 0.8 y un $\alpha=0.05$.

5.2. Mediciones antropométricas

Las mediciones antropométricas, como peso y talla, fueron tomadas de acuerdo a la técnica de Lehmann (1998) con equipos que cumplieron las normas de calidad establecidas internacionalmente. El IMC se calculó dividiendo el peso expresado en kilogramos entre la estatura en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2).

5.3 Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales

Se obtuvieron muestras sanguíneas en ayuno de 12 horas, en las que se midieron distintos parámetros bioquímicos y hormonales. Las concentraciones de lípidos, glucosa, insulina, creatinina, ácido úrico, ALT, AST y GGT se determinaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) con procedimientos previamente descritos [103]. Para medir las concentraciones séricas de SFRP5, WNT5A, adiponectina y leptina, se utilizó el método de ensayo por

inmunoabsorción ligado a enzimas (leptina y adiponectina: EMD Millipore, St. Charles, MO, USA; SFRP5 y WNT5A: MyBioSource, San Diego, California, USA).

El modelo HOMA-IR fue empleado para calcular la resistencia a la insulina [104]:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glucosa (mmol/L)} \times \text{insulina (mUI/L)}}{22.5}$$

La concentración normal de glucosa en ayuno se definió con un valor <100 mg/dL. La diabetes tipo 2 se definió por reporte de tratamiento hipoglucemiante o un valor de glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL [105]. Adicionalmente, la resistencia a la insulina fue evaluada con el cociente LAR, cuyo valor se obtiene al dividir la concentración la concentración sérica de leptina entre la de adiponectina circulante, y correlaciona con el índice de sensibilidad a la insulina medido por pinza euglucémica hiperinsulinémica [62].

5.4. Análisis histológico

Las biopsias hepáticas se tomaron del borde libre del lóbulo izquierdo mediante la técnica de resección en cuña con bisturí armónico. Cada biopsia fue depositada en un tubo con RNA later (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y congelada a -70°C para su conservación. Una porción de la biopsia hepática se fijó en formaldehído y fue embebida en parafina, seccionada y teñida con hematoxilina-eosina y tricómico de Masson. La caracterización histológica de la biopsia

hepática de todas las participantes fue realizada por un patólogo experimentado del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Para ello, se empleó el sistema de puntuación semicuantitativo propuesto por Kleiner y cols. (2005), el cual incluye grado de esteatosis, grado de inflamación y grado de balonamiento hepatocelular [60]. En la tabla 1 se describen los grados para cada una de las características histológicas.

Tabla 1. Descripción de las características histológicas empleadas en el sistema de puntuación semicuantitativo de Kleiner.

	Esteatosis	Inflamación lobular	Balonamiento
Grado 0	< 5% de grasa hepática	Ningún foco de inflamación	Sin balonamiento
Grado 1	5 - 33% de grasa hepática	< 2 focos de inflamación/20x campo óptico	Poco balonamiento
Grado 2	>33 - 66% de grasa hepática	2 – 4 focos de inflamación/20x campo óptico	Abundante balonamiento
Grado 3	>66% de grasa hepática	>4 focos de inflamación/20x campo óptico	No aplica
Puntaje máximo	3	3	2

El puntaje de actividad del HGNA (NAS) se obtuvo sumando los distintos grados de esteatosis, inflamación lobular y el balonamiento, el cual se empleó para definir la presencia de EHNA. Con base en estas tres características histológicas y el NAS, las mujeres fueron clasificadas en 4 grupos de estudio: 1) sin HGNA (sin esteatosis); 2) esteatosis simple (NAS 1-2); 3) EHNA indefinida (NAS 3-4); y 4) EHNA (NAS≥5).

La escala de fibrosis (F) que se consideró tiene un rango de 0-4: F0 = sin fibrosis; F1 = 1a/1b, fibrosis perisinusoidal poco a moderada en la zona 3 y 1c, solo fibrosis periportal o portal; F2 = fibrosis perisinusoidal con fibrosis portal/periportal; F3 = fibrosis en puente; y F4 = cirrosis.

5.5 Determinación del contenido hepático de triacilglicéridos

La extracción de lípidos hepáticos se llevó a cabo mediante el método de Folch [106], utilizando 50 mg de tejido. Las muestras se homogenizaron en solución de NaCl_2 al 0.09% y los lípidos totales fueron extraídos con cloroformo/metanol (2:1). Los triacilglicéridos se midieron con un ensayo colorimétrico (Diagnostic systems, Holzheim, Germany) y fueron normalizados con la concentración total de proteína.

5.6. Extracción de mRNA y síntesis del cDNA de tejido hepático y adiposo

Las biopsias de hígado y tejido adiposo (subcutáneo y visceral) se almacenaron en 2 mL de RNA later a -70°C (Applied Biosystems). La extracción del RNA total del tejido adiposo visceral y subcutáneo se realizó con el producto RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) y la del tejido hepático, con el reactivo Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). El RNA total se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, ThermoScientific, Wilmington, DE, USA).

Posteriormente, se utilizaron 500 ng de RNA total para realizar la síntesis de cDNA empleando el estuche TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems).

5.7. Cuantificación de la expresión de *SFRP5*, *WNT5A* y *ADIPOR2* mediante PCR tiempo real

La expresión de *SFRP5*, *WNT5A* y *ADIPOR2*, así como la de los genes de expresión constitutiva (*ACTB* β -actina y *GAPDH* gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa) se cuantificó por PCR tiempo real usando el producto LightCycler TaqMan Master Real time PCR, en el equipo Light Cycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). La cuantificación del mRNA de *SFRP5* se realizó con la sonda TaqMan Gene expression assay Hs00169366_m1 (Applied Biosystems). Para la cuantificación de *WNT5A*, *ACTB* y *GAPDH* se emplearon las sondas LNA Taqman de la Librería de Sondas Universales (Roche). El diseño de los oligonucleótidos y selección de la sonda se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/upl/index.jsp?id=UP030000>). Los oligonucleótidos y sondas empleados se enlistan en la tabla 2. Los niveles relativos de mRNA de *SFRP5*, *WNT5A* y *ADIPOR2* en relación a *ACTB* fueron calculados con el software LightCycler Relative Quantification Analysis por el método matemático $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 2. Oligonucleótidos y sondas para la cuantificación de mRNA mediante PCR tiempo real.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia de referencia</i>	<i>Oligonucleótidos (forward/reverse)</i>	<i>No. Sonda (No. catálogo)</i>
<i>WNT5A</i>	NM_001256105, NM_003392	TTCTGGCTCCACTTGTTGC GCCAAAGCCACTAGGAAGAA	119 (04692306001)
<i>ADIPOR2</i>	NM_024551.2	GGGCATTGCAGCCATTAT AGGCCCAAAAACACTCCTG	14 (04685130001)
<i>ACTB</i>	NM_001101	CCAACCGCGAGAAGATGA CCAGAGGCGTACAGGGATAG	64 (04688635001)
<i>GAPDH</i>	NM_002046	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	60 (04688589001)

5.8. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron 70 mg de muestra de tejido hepático y adiposo. El tejido fue homogenizado en RIPA frío adicionado con inhibidores de proteasa (Roche), ortovanadato de sodio y fluoruro de sodio. Posteriormente, el homogenado fue centrifugado y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Lowry con el producto DC protein Assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

5.9. Extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas

Para la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas se emplearon 50 mg de muestra de tejido hepático. La extracción se realizó con el producto ProteoJET Cytoplasmatic and Nuclear Protein Extraction siguiendo las instrucciones del fabricante (Fermentas, Canada). La concentración de proteínas de los extractos nucleares y citoplasmáticos se cuantificó de la misma manera que el extracto de

proteínas totales.

5.10. Cuantificación de las proteínas SFRP5 y WNT5A mediante hibridación tipo Western

Los extractos totales, citoplasmáticos y nucleares de las proteínas hepáticas (50 µg), fueron separados por SDS-PAGE en geles al 10% y transferidos a membranas de fluoruro de polivinilidina (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Las membranas se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios anti-SFRP5 (hecho en cabra), anti-WNT5A (hecho en ratón), anti- α -TUBULINA (hecho en ratón) y anti-LAMININA A/C (hecho en ratón) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). La proteína α -tubulina fue utilizada para normalizar la cantidad de proteína cargada del extracto de proteínas totales y de la fracción citoplasmática. La normalización en el extracto nuclear se realizó con LAMININA A/C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante una hora y media con sus respectivos anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano. Las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia empleando el producto ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) y las señales de las proteínas fueron cuantificadas con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Debido a que el tamaño de la muestra biológica fue pequeño, solo fue posible analizar las 54 muestras por duplicado. Los resultados se muestran como el cociente de SFRP5/ α -TUBULINA o WNT5A/ α -TUBULINA.

5.11. Análisis de metilación del promotor de *SFRP5*

El DNA del tejido hepático fue extraído mediante el estuche High Pure PCR Template (Roche) y cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop 2000c). Posteriormente, el DNA fue modificado con el estuche EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Se emplearon dos técnicas para determinar los patrones de metilación de *SFRP5*: PCR específica para metilación (MSP) y High Resolution Melting sensible a metilación (HRM-metilación, análisis de curvas de disociación de alta resolución). El patrón de metilación de la región del promotor de *SFRP5*, comprendida entre -326 a -191 pb, se analizó por MSP empleando los oligonucleótidos previamente reportados (Tabla 3) [87,92]. Posteriormente, la región del promotor comprendida de -150 a -74 pb fue analizada a través de la técnica HRM-metilación (Tabla 2). Para esta técnica, se diseñó un par de oligonucleótidos considerando los siguientes criterios: 1) cada oligonucleótido debe tener uno o dos dinucleótidos CpG; 2) los CpGs deben estar localizados lo más cerca posible al extremo 5' de los oligonucleótidos; 3) las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos deben ser muy semejantes, de preferencia no mayor a un 1°C; 4) el extremo 3' de los oligonucleótidos debe tener uno o más nucleótidos de timina, correspondientes a los nucleótidos de citosinas que no son CpG, para asegurar la amplificación única de los templados que fueron modificados por bisulfito; 5) se debe mantener los parámetros estándar de un diseño de oligonucleótidos evitando estructuras secundarias, formación de dímeros, etc.; y 6) procurar que la longitud del amplicón sea de alrededor de 100

pb, para reducir la complejidad del perfil de fusión [107]. En ambas técnicas se utilizaron DNA comerciales como controles de DNA alta y bajamente metilado (EpigenDX, Hopkinton, MA, USA). La amplificación se llevó a cabo con el reactivo LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche) en el equipo Light Cyler 480 II (Roche).

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en MSP y HRM metilación.

	Forward	Reverse
SFRP5-U (MSP)	GTAAGATTTGGTGTGGGTGGGATGTTT	AAAACCTCCAACCCAAACCTCACCATACA
SFRP5-M (MSP)	AAGATTTGGCGTTGGGCGGGACGTTT	ACTCCAACCCGAACCTCGCCGTACG
SFRP5-HRM	TGCGTTTTCGGTTTTGATTTATTTAGT	TTAGGTGGGTGGTAGTTTGCCT

El par de oligos -U identifica el amplicón con citocinas no metiladas y el par de oligos -M identifica el amplicón con citocinas no metiladas

5.12. Inmunohistoquímica de SFRP5 en el tejido hepático

A partir de los bloques generados para la evaluación histológica, se realizaron cortes de 3 μ m de grosor de biopsias de 3 mujeres sin HGNA con las concentraciones hepáticas más altas de SFRP5 y de 3 con EHNA y las concentraciones más bajas. Los cortes de las muestras de hígado fueron desparafinados, tratados para recuperación antigénica con la solución 20X ImmunoDNA Retriever Citrate, bloqueados con la solución ImmunoDetector Peroxidase Blocker (Bios SB, Santa Barbara CA, USA), e incubados con dos anticuerpos anti-SFRP5 diferentes (monoclonal y policlonal; Santa Cruz

Biotechnology). Las muestras fueron tratadas con los reactivos *Goat/Mouse probe* y *Goat/Mouse-On-Rodent HRP-Polymer* (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Finalmente, se añadió el cromógeno 3-3'-diaminobencidina y se realizó una contra-tinción con hematoxilina.

5.13. Análisis estadístico

La concentración hepática de SFRP5 (mRNA y proteína), la concentración sérica de insulina, triacilglicéridos, AST, ALT, GGT, HOMA-IR y contenido hepático de triacilglicéridos fueron transformados a logaritmo para obtener una distribución normal. Las comparaciones entre los grupos sin y con fibrosis fueron realizadas con la prueba de t-Student o la prueba U de Mann-Whitney, dependiendo de la distribución de las variables analizadas. Para la comparación de más de dos grupos, i.e. los grupos sin HGNA, esteatosis, EHNA indefinida y EHNA, se utilizaron las pruebas ANOVA o Kruskal Wallis, dependiendo la distribución de las variables.

El resultado de la asociación de SFRP5 (mRNA, proteína y suero) con el HGNA fue ajustado por las covariables: presencia de DT2 y tratamiento farmacológico mediante modelos lineales generalizados debido a que se ha reportado que estas variables afectan su expresión. Los coeficientes de correlación entre variables cuantitativas se obtuvieron con la prueba de Spearman.

Se utilizó un análisis multivariado para construir un modelo predictivo del

HGNA, incluyendo las variables de edad, IMC, triacilglicéridos, colesterol total, C-HDL, adiponectina, leptina, insulina, HOMA-IR y proteína hepática SFRP5.

Para la asociación entre variables categóricas se empleó la prueba de Chi-cuadrada. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS v.20 (SPSS, Chicago, USA).

5.14. Análisis de expresión génica global en tejido hepático

Para evaluar si la concentración de SFRP5 en el hígado se asocia con un perfil específico de expresión en este órgano, se realizó un estudio de expresión génica global en el tejido hepático de 12 de las 54 mujeres. Las participantes fueron seleccionadas considerando el tercil más bajo y el más alto de las concentraciones hepáticas de la proteína SFRP5 (tercil 1 $n=6$ y tercil 3 $n=6$). Para ello, el análisis de expresión génica global se realizó mediante el microarreglo de expresión Gene Chip® Human Gene 1.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). El tamaño de la muestra se calculó con el paquete “Sizepower” en R [108]. Este paquete considera el número de genes que se espera encontrar diferencialmente expresados (GO), las veces de cambio mínimo esperado (ERO), el poder estadístico (θ) y la desviación estándar (σ). Los valores empleados para calcular el tamaño mínimo de este estudio piloto fueron los siguientes: GO=200, ERO=0.59, $\theta=0.8$. y $\sigma=0.8$. El tamaño de la muestra calculado bajo estos criterios fue de 5 sujetos por grupo.

5.14.1. Extracción del RNA para la expresión génica global por microarreglos

El RNA total del tejido hepático fue extraído con el producto RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) y cuantificado por espectrofotometría con el NanoDrop 2000c. Para el análisis de expresión global en microarreglos se determinó la integridad del RNA total extraído mediante electroforesis capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer, Alemania). Sólo las muestras de RNA con un RIN (RNA integrity number) ≥ 6.5 fueron analizadas.

5.14.2. Análisis de expresión génica global mediante microarreglos

El microarreglo Gene Chip® Human Gene 1.0 (Affymetrix) contiene un número estimado de 28,869 genes, con una mediana de 26 sondas para cada gen. El análisis de expresión génica por microarreglo se realizó en la plataforma de Affymetrix en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Todos los procedimientos fueron desarrollados de acuerdo al manual Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical (Affymetrix). De manera breve, la técnica empleada para los microarreglos fue la siguiente: a partir de 200 ng de RNA total de cada muestra se sintetizó DNA complementario de una hebra (cDNA) utilizando Superscript II transcriptasa reversa y hexámeros al azar. Posteriormente, se sintetizó la segunda hebra del cDNA utilizando DNA polimerasa. El DNA de

doble cadena sintetizado (dsDNA) se empleó para generar el RNA complementario (cRNA) marcado con biotina mediante transcripción *in vitro*, posteriormente fue purificado y cuantificado. A partir de este cRNA se sintetizó nuevamente cDNA mediante transcripción reversa en la cual, a diferencia de la primera síntesis, se incorporan dUTPs. El cRNA restante fue hidrolizado con RNasa H. El nuevo cDNA obtenido fue cuantificado y fragmentado por la DNasa I hasta obtener fragmentos de 40-70 pares de bases (pb), los cuales se marcaron con biotina. El DNA marcado se hibridó en los microarreglos durante 16 horas a 45° C en un horno de hibridación (Affymetrix Gene Chip hybridization oven). Posterior a la hibridación, los microarreglos fueron lavados y teñidos con estreptavidina-ficoeritrina en la estación de fluidos de acuerdo a la instrucciones del fabricante (Affymetrix Gene Chip Fluidics station FS450). La fluorescencia se amplificó adicionando anti-estreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de estreptavidina-ficoeritrina. Finalmente, se empleó un escáner confocal (Affymetrix Gene Chip scanner 3000 7G) para coleccionar la señal fluorescente.

5.14.3. Análisis estadístico de los datos de expresión génica global

El análisis estadístico de los microarreglos se realizó con el paquete Bioconductor, Limma (<http://www.bioconductor.org>) en el programa R. Se realizó la corrección de fondo por RMA (Robust Multi-array Average) [109]. Todas las muestras fueron normalizadas por cuantiles [110]. Después, se realizó el contraste de los niveles de expresión de los genes del microarreglo entre las mujeres del tercil 1 versus las

del tercil 3 [111]. Los criterios de selección de los genes fueron: un valor de significancia menor o igual a 0.05 y un valor de veces de cambio ≤ -1.5 en genes sub-expresados y ≥ 1.5 para los genes sobre-expresados.

Con el fin de evaluar si los genes que mostraron expresión diferencial entre los dos grupos corresponden a alguna red biológica conocida, se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas en los siguientes programas bioinformáticos: Ingenuity Pathways Analysis (<https://targetexplorer.ingenuity.com>) y Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de la población de mujeres con obesidad clase II y III

El estudio comprendió 54 mujeres con obesidad (22.6% presentó obesidad clase II con una o más comorbilidades y el 77.4% presentó obesidad clase III). La frecuencia del HGNA en esta población fue de 83.3%, de las cuales el 24.1% presentó esteatosis simple, el 18.5% EHNA indefinida y 40.7% presentó EHNA (Figura 5).

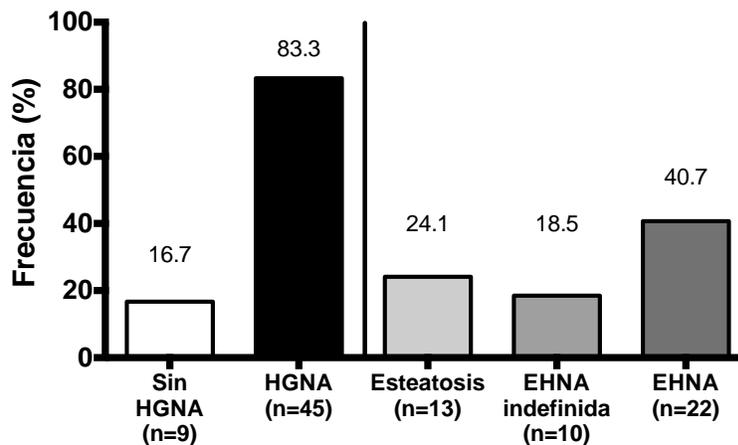


Figura 5. Frecuencia del HGNA en la población con obesidad clase II y III.

La comparación de las características clínicas y bioquímicas entre los grupos se presenta en la tabla 4. La edad y el IMC no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos. Las concentraciones séricas de

triacilglicéridos fueron significativamente más bajas en las mujeres sin HGNA que aquellas con esteatosis, EHNA indefinida y EHNA. En contraste, las concentraciones circulantes de C-HDL fueron más altas en las mujeres sin HGNA, aunque la diferencia solo fue estadísticamente significativa al comparar los grupos sin HGNA y EHNA. Adicionalmente, las concentraciones séricas de glucosa fueron significativamente más bajas en las mujeres sin HGNA que aquellas con EHNA. La tabla 4 muestra que el contenido hepático de triacilglicéridos incrementó conforme aumentó el daño al hígado, siendo mayor en las mujeres con EHNA que en aquellas sin HGNA. Además, la frecuencia de DT2 también aumentó con la progresión del HGNA, aunque solo se observó diferencia significativa entre las pacientes sin HGNA en comparación con las que presentan EHNA.

Tabla 4. Parámetros antropométricos y bioquímicos de las mujeres del estudio

	Sin HGNA (n=9)	Esteatosis (n=13)	EHNA indefinida (n=10)	EHNA (n=22)	Valor de <i>P</i>
Edad (años)	34.33 ± 7.75	36.69 ± 8.85	39.1 ± 11.15	35.05 ± 9.55	NS
IMC (kg/m²)	44.16 ± 5.93	41.8 ± 3.72	45.2 ± 5.12	45.58 ± 6.83	NS
Glucosa (mg/dL)	98.76 ± 13.11	100.75 ± 15.85	108.89 ± 19.16	120.71 ± 21.34	0.02 ^c
Insulina (mUI/L)	11.0 (5.0 – 15.3)	12.6 (4.3 – 28.6)	8.9 (6.1 – 19.9)	10.3 (8.4 – 40.2)	NS
HOMA-IR	2.7 (1.2 – 3.5)	4.0 (1.5 – 6.9)	2.3 (1.8 – 5.9)	3.1 (2.2 – 11.7)	NS
Triacilglicéridos (mg/dL)	89.9 (69.9 – 112.3)	164.0 (97.5 – 211.5)	147.5 (116.0 – 166.8)	138.0 (114.0 – 190.8)	0.003 ^{b,c}
Colesterol total (mg/dL)	162.12 ± 25.95	186.92 ± 46.47	163.8 ± 22.42	159.64 ± 30.84	NS
C-HDL (mg/dL)	38.9 ± 10.84	34.52 ± 11.1	32.12 ± 9.64	31.28 ± 9.4	0.02 ^c
C-LDL (mg/dL)	105.09 ± 24.26	120.42 ± 33.33	100.9 ± 11.95	98.09 ± 24.16	NS
AST (UI/L)	22.0 (18.5 – 46.5)	30 (22.0 – 72.5)	39.0 (25.5 – 64.5)	42.0 (22.5 – 71.50)	NS
ALT (UI/L)	16.0 (11.5 – 30.00)	22.0 (19.5 -44.0)	22.0 (19.0 – 47.5)	31.0 (26.0 – 45.0)	NS
GGT (UI/L)	12.0 (9.0 – 20.0)	13.0 (11.5 – 34.0)	15.5 (13.0 – 26.0)	19.0 (14.0 – 29.0)	NS
Ácido úrico (mg/dL)	5.38 ± 0.97	6.33 ± 1.25	6.19 ± 0.65	6.39 ± 1.3	NS
Creatinina (mg/dL)	0.66 ± 0.15	0.87 ± 0.19	0.77 ± 0.24	0.77 ± 0.12	NS
DT2 (%)	1 (11.1)	3 (23.1)	4 (40.0)	15 (68.2)	<0.02 ^c
Hipoglucemiantes (%)	0	0	3 (30.0)	10 (45.5)	<0.04 ^{a,e}
RI** (%)	4 (57.1)	3 (33.5)	3 (60.0)	3 (60.0)	NS
Fibrosis (%)	1 (8.3)	3 (18.8)	3 (18.8)	12 (30.8)	NS
Contenido hepático de triacilglicéridos (mg Tg/mg proteína)	0.52 ± 0.003	0.92 ± 0.002	1.14 ± 0.002	2.61 ± 0.002	<0.03 ^{c,e,f}

Los datos representan la media ± desviación estándar o la mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; C-HDL, colesterol HDL; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transferasa; RI**, Resistencia a la insulina solo en sujetos sin DT2; NS, no significativo. La insulina, HOMA-IR, triacilglicéridos, AST, ALT, and GGT fueron transformados con log base 10. Comparaciones: a) Sin HGNA vs. esteatosis, b) Sin HGNA vs. EHNA indefinida, c) Sin HGNA vs. EHNA, d) esteatosis vs. EHNA indefinida, e) esteatosis vs. EHNA, f) EHNA indefinida vs. EHNA

6.2 Correlación entre las concentraciones séricas de SFRP5, adiponectina, leptina, y su relación con parámetros antropométricos y metabólicos

De manera interesante, se observó que las concentraciones de SFRP5 correlacionaron positivamente con las concentraciones séricas de adiponectina ($r=0.330$, $P=0.024$, $n=47$, tabla 5), pero negativamente con las concentraciones circulantes de leptina ($r=-0.381$, $P=0.008$, $n=47$, tabla 5) y con el cociente leptina/adiponectina (LAR, $r=-0.455$, $P=0.001$, $n=47$).

La tabla 5 muestra que las concentraciones séricas de SFRP5 no correlacionaron significativamente con ninguno de los parámetros antropométricos y bioquímicos. En contraste, las concentraciones séricas de adiponectina correlacionaron negativamente con las concentraciones circulantes de triacilglicéridos y las actividades de GGT ($r=-0.304$, $P=0.030$ y $r=-0.352$, $P=0.011$, respectivamente), pero positivamente con las concentraciones de C-HDL ($r=0.405$, $P=0.003$). Además, las concentraciones séricas de adiponectina correlacionaron negativamente con la resistencia a la insulina calculada por HOMA-IR ($r=-0.382$, $P=0.03$; excluyendo mujeres con DT2). Mientras que las concentraciones séricas de leptina correlacionaron positiva y significativamente con el IMC y las concentraciones circulantes de insulina ($r=0.292$, $P=0.040$ y $r=0.317$, $P=0.023$, respectivamente).

Tabla 5. Correlación de las concentraciones séricas de SFRP5, adiponectina y leptina con parámetros antropométricos y bioquímicos

	SFRP5	ADIPONECTINA	LEPTINA
Edad	-0.055 (0.718)	-0.004 (0.976)	-0.088 (0.539)
IMC	-0.159 0.303	0.138 (0.341)	0.292* (0.040)
Glucosa	-0.184 (0.231)	-0.155 (0.293)	-0.144 (0.33)
Insulina	-0.097 (0.516)	-0.251 (0.075)	0.317* (0.023)
HOMA-IR[†]	-0.159 (0.303)	-0.382 (0.031)	0.244 (0.178)
Triacilglicéridos	0.037 (0.806)	-0.304* (0.03)	-0.182 (0.201)
Colesterol total	0.036 (0.808)	0.166 (0.243)	-0.008 (0.954)
C-HDL	0.201 (0.175)	0.405** (0.003)	0.049 (0.735)
C-LDL	-0.104 (0.488)	0.146 0.305	0.099 (0.489)
AST	-0.151 (0.315)	-0.112 (0.440)	0.092 (0.526)
ALT	0.227 (0.129)	-0.046 (0.750)	0.117 (0.418)
GGT	-0.063 (0.676)	-0.352* (0.011)	0.027 (0.851)
Leptina sérica	-0.381** (0.008)	0.171 (0.23)	–
Adiponectina sérica	0.330* (0.024)	–	0.171 0.230
CHTG	0.056 (0.72)	-0.295 (0.044)	0.037 (0.807)

Los datos representan el coeficiente de correlación de Spearman y entre paréntesis es el valor de significancia. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; C-HDL, colesterol HDL; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transferasa; CHTG, contenido hepático de triacilglicéridos; TG, triacilglicéridos; Prot, proteína. †Análisis solo sin DT2. *P<0.05, **P<0.001

6.3 Asociación de las concentraciones circulantes de SFRP5, adiponectina y leptina con el HGNA y la fibrosis hepática

Las concentraciones séricas de SFRP5 no correlacionaron con un mayor contenido hepático de triacilglicéridos (Figura 6a). Asimismo, en la figura 6b se muestra que las concentraciones séricas de SFRP5 no se asociaron con el grado de esteatosis, ni con la presencia de esteatohepatitis (figura 6c).

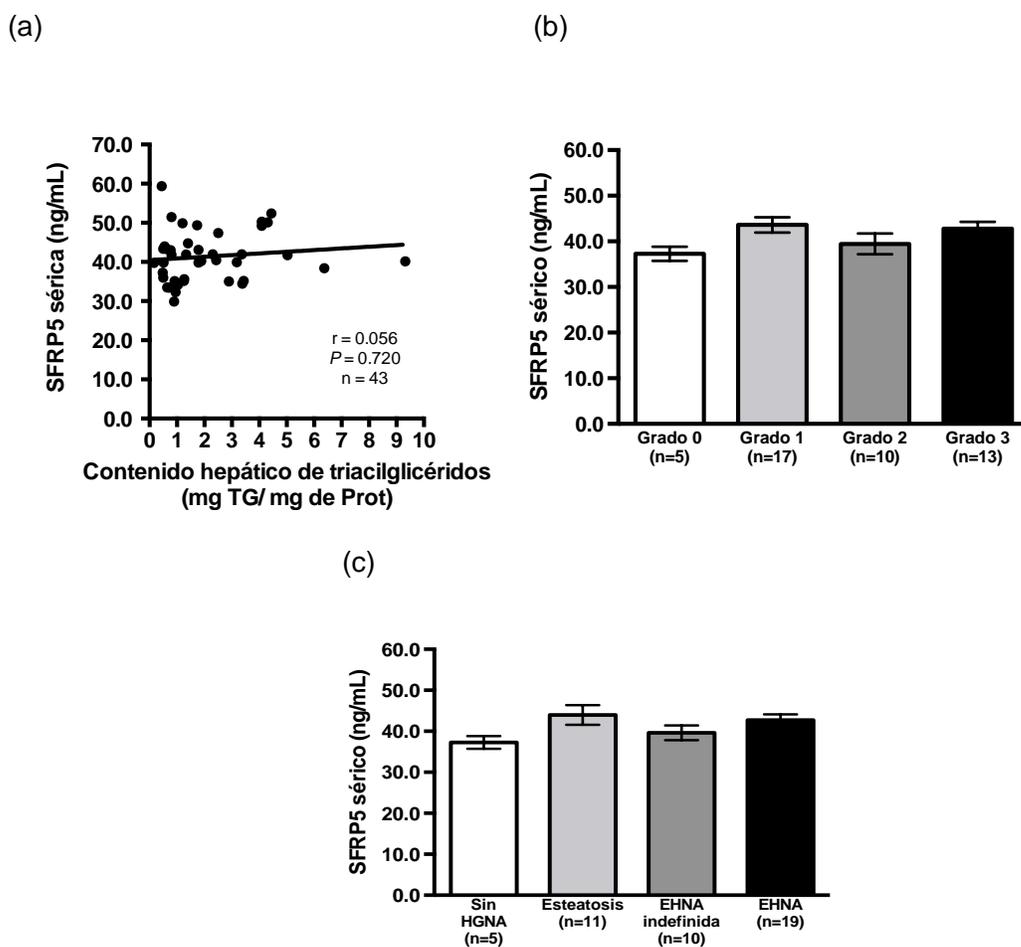


Figura 6. Concentraciones séricas de SFRP5 en mujeres y su asociación con el HGNA. (a) Correlación entre las concentraciones séricas de SFRP5 y el contenido hepático de triacilglicéridos; (b) Asociación de las concentraciones circulantes de SFRP5 con el grado de esteatosis hepática ajustado por estatus de DT2 e hipoglucemiantes ($P > 0.05$); (c) Asociación de las concentraciones de SFRP5 circulante con el HGNA ajustado por estatus de DT2 e hipoglucemiantes ($P > 0.05$). Los datos están representados como la media \pm el error estándar, (n=45).

En contraste, en la figura 7a se observa que las concentraciones séricas de adiponectina disminuyeron significativamente conforme aumentó el contenido hepático de triacilglicéridos ($r=-0.295$, $P=0.044$). De manera consistente, se observó reducción de la concentración de adiponectina conforme aumentó el grado de esteatosis (figura 7c), aunque solo se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las mujeres sin esteatosis con aquellas con grado 3 de esteatosis ($P=0.040$). Sin embargo, las concentraciones circulantes de leptina no incrementaron conforme aumentó el contenido hepático de triacilglicéridos en las mujeres (figura 7b). En consistencia con este hallazgo, las concentraciones de leptina tampoco aumentaron con el mayor grado de esteatosis (figura 7d).

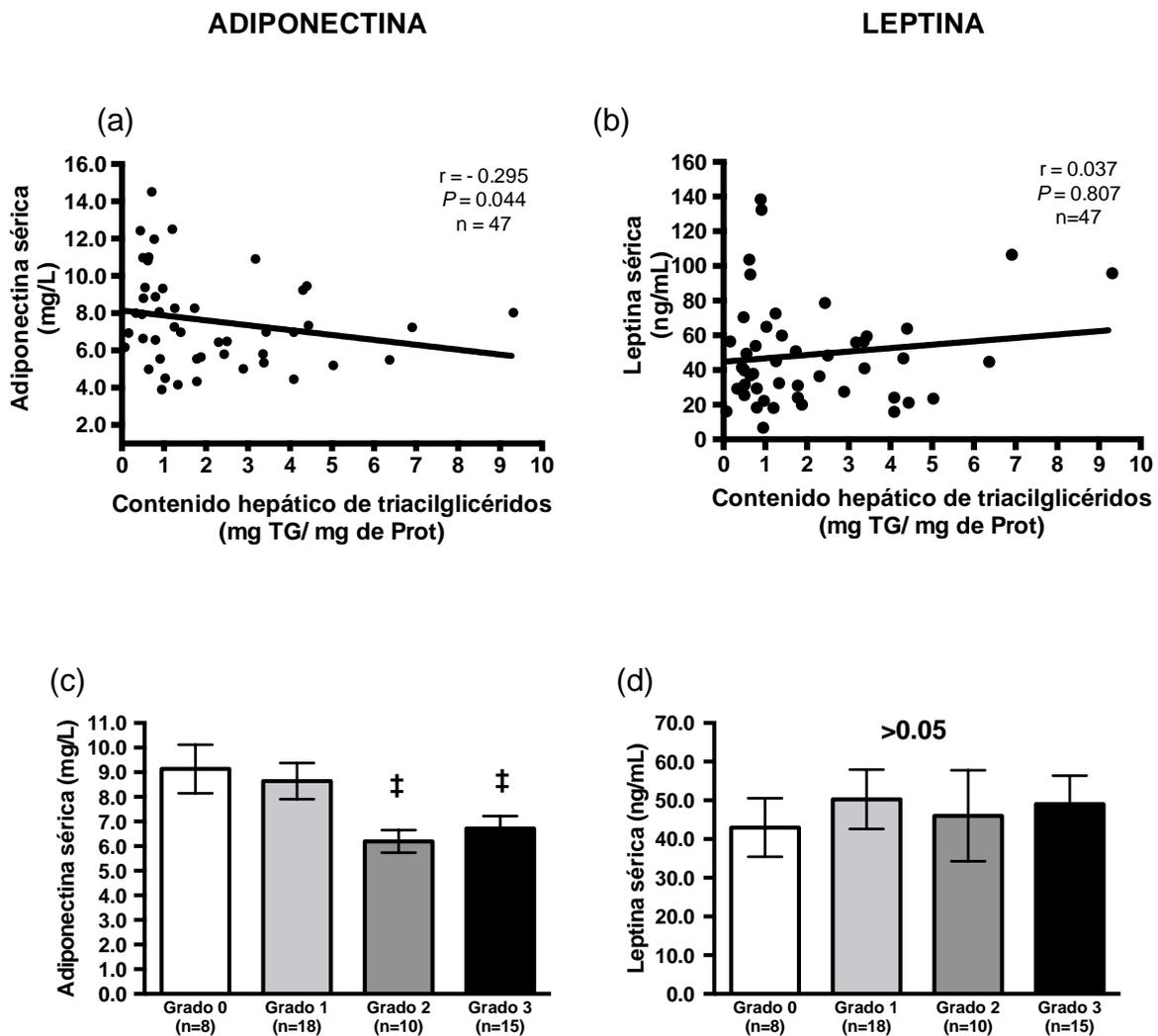


Figura 7. Relación de la acumulación de la grasa hepática con las concentraciones séricas de las adipocinas: adiponectina y leptina. (a) Correlación entre el contenido hepático de triacilglicéridos con las concentraciones circulantes de adiponectina; (b) Correlación entre el contenido hepático de triacilglicéridos con las concentraciones séricas de leptina; (c) Asociación del grado de esteatosis con las concentraciones circulantes de adiponectina; y (d) Asociación del grado de esteatosis con las concentraciones séricas de leptina. En (c) y (d), los datos están representados como la media \pm el error estándar, $n = 51$. $\ddagger P < 0.05$ vs. Grado 0. El resultado para leptina fue ajustado por IMC dado su asociación a este parámetro (sección 7.2).

En la figura 8 se muestra la asociación de la adiponectina y la leptina con la progresión del HGNA. A diferencia de las concentraciones de SFRP5, las concentraciones circulantes de adiponectina disminuyeron conforme la progresión del HGNA. Las concentraciones séricas de adiponectina fueron similares entre las

mujeres sin HGNA y esteatosis simple ($P>0.05$), pero significativamente más bajas en mujeres con EHNA indefinida y EHNA ($P=0.028$, Figura 8a). En contraste, las concentraciones séricas de leptina no se modificaron significativamente con el grado de daño al hígado ($P= 0.7$, Figura 8b).

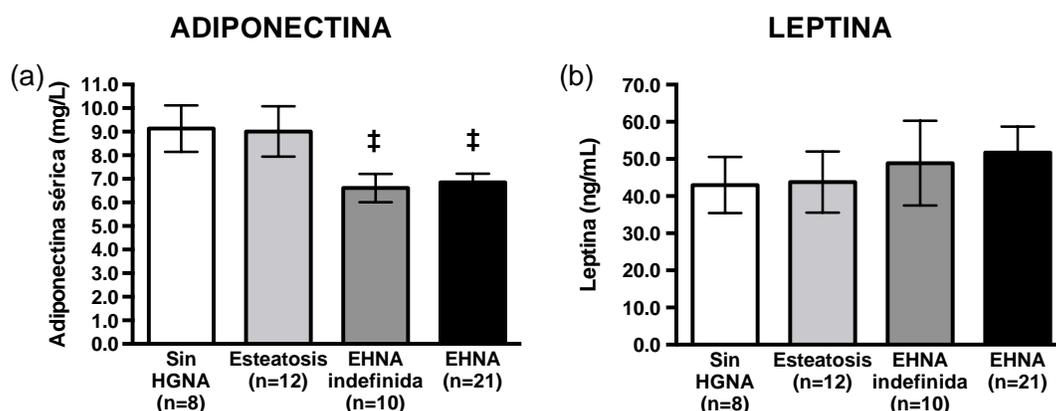


Figura 8. Distribución de las concentraciones séricas de adiponectina y leptina en mujeres con HGNA. (a) Asociación de las concentraciones circulantes de adiponectina con el HGNA; (b) Asociación de las concentraciones séricas de leptina con el HGNA. Los datos están representados como la media \pm el error estándar. [‡] $P<0.05$ vs. sin HGNA. El análisis para leptina fue ajustado por IMC.

Asociación de los niveles de expresión hepática del receptor ADIPOR2 con el HGNA

Dada la asociación observada entre la concentración sérica de adiponectina con la EHNA, se determinó si la expresión hepática del receptor *ADIPOR2* se modificaba en el HGNA. En la figura 9 se muestra una tendencia a incrementar la expresión hepática de *ADIPOR2* conforme avanza la severidad del HGNA. Sin embargo, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

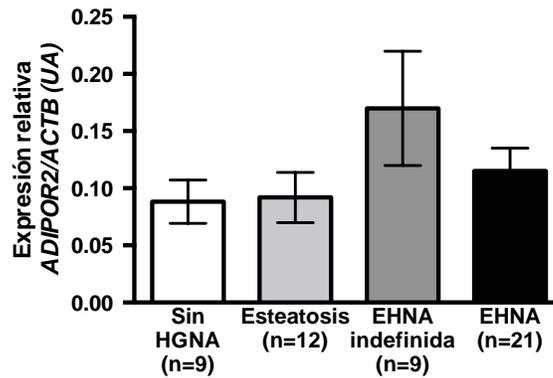


Figura 9. Expresión hepática del receptor ADIPOR2 en el HGNA. Asociación de los niveles hepáticos de expresión del mRNA de ADIPOR2 con el HGNA ($P > 0.05$). Los datos están representados como la media \pm el error estándar.

La asociación de SFRP5 circulante con la fibrosis, mostró concentraciones séricas disminuidas de SFRP5 en mujeres con fibrosis grado 1 y 2 (F1+F2, n=8), en comparación con aquellas sin fibrosis (F0, n=39); aunque la diferencia no fue significativa ($P = 0.25$, figura 10).

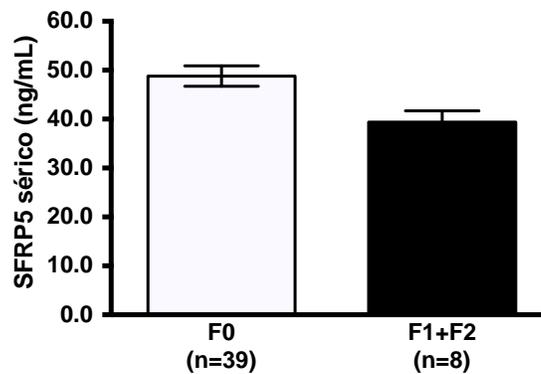


Figura 10. Asociación de las concentraciones séricas de SFRP5 con la fibrosis hepática. (a) Asociación de las concentraciones séricas de SFRP5 con la fibrosis hepática ($P > 0.05$). Los datos están representados como la media \pm error estándar de la media.

En la figura 11a se observa que las mujeres con fibrosis presentaron concentraciones séricas de adiponectina menores que aquellas sin fibrosis. Mientras que las mujeres con fibrosis (F1+F2) presentaron un incremento en la concentración de leptina en comparación con aquellas sin fibrosis (Figura 11b). Sin embargo, en ambas comparaciones las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

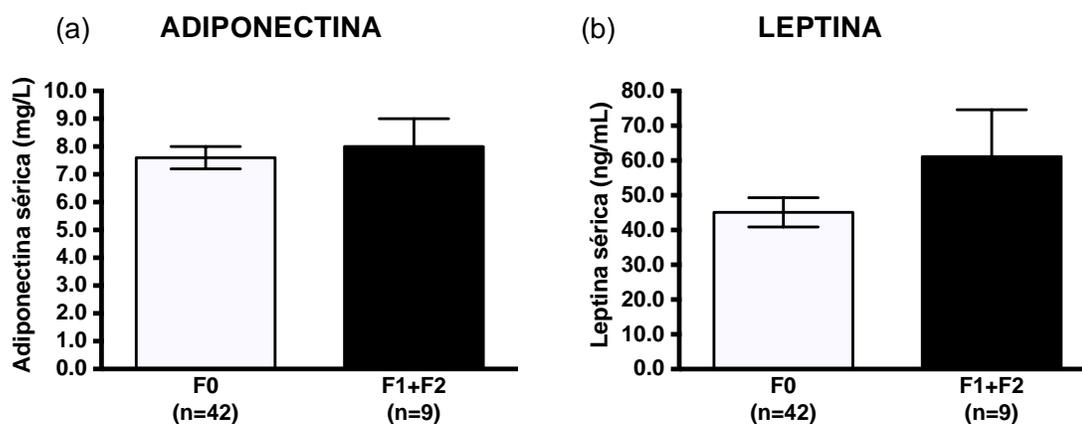


Figura 11. Concentraciones séricas de adiponectina y leptina en la fibrosis hepática. (a) Asociación de las concentraciones séricas de adiponectina con la fibrosis hepática ($P > 0.05$); (b) Asociación de las concentraciones circulantes de leptina con la fibrosis hepática ($P > 0.05$). Los datos están representados como la media \pm error estándar de la media.

6.4 Expresión de *SFRP5* en tejido adiposo y hepático: Asociación con el HGNA

6.4.1 Expresión de *SFRP5* en tejido adiposo y hepático

Los niveles de mRNA de *SFRP5* se detectaron en el 35.2% de las muestras del tejido adiposo subcutáneo y en el 59.3% de las muestras del tejido adiposo visceral. En contraste, el mRNA de *SFRP5* fue detectado en el 100% de la

muestras de tejido hepático, con niveles más altos a los observados en el tejido adiposo ($P= 2.9 \times 10^{-5}$ para el tejido subcutáneo y $P= 2.6 \times 10^{-8}$ para el tejido visceral) (Figura 12a). De igual manera, la proteína SFRP5 fue detectada y cuantificada en todas las muestras de tejido hepático, a diferencia de los niveles bajos o no detectables en el tejido adiposo (Figura 12b).

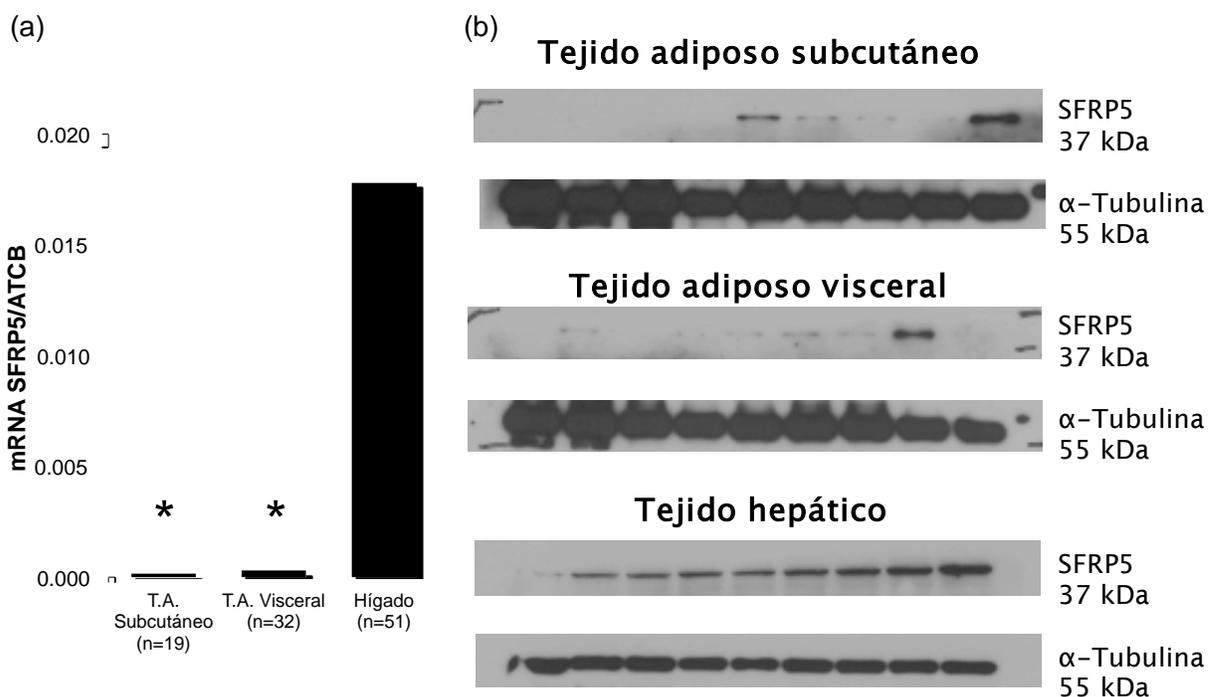


Figura 12. Expresión de SFRP5 en tejido adiposo (visceral y subcutáneo) y hepático. (a) Comparación de la expresión relativa de SFRP5 (mRNA) entre el tejido adiposo (subcutáneo y visceral) y tejido hepático por PCR tiempo real; (b) Comparación del inmunoblot de la proteína SFRP5 entre el tejido adiposo (subcutáneo y visceral) y el tejido hepático. Las membranas para SFRP5 y α -tubulina en el tejido adiposo fueron sobre-expuestas, y aun así SFRP5 no fue detectada, mientras que la señal de α -tubulina se observa sobre-saturada. Los datos están representados como la media \pm el error estándar. * $P < 0.05$ vs tejido hepático.

6.4.2 Correlación de la expresión hepática de *SFRP5* con parámetros antropométricos y bioquímicos

Los niveles hepáticos del mRNA de *SFRP5* no correlacionaron con ninguno de los parámetros bioquímicos analizados (Tabla 6). En contraste, las concentraciones hepáticas de la proteína *SFRP5* correlacionaron negativamente con las actividades enzimáticas de ALT ($r = -0.437$, $P = 0.001$) y GGT ($r = -0.287$, $P = 0.037$).

Tabla 6. Correlación entre las concentraciones hepáticas de SFRP5 (mRNA y proteína) y parámetros antropométricos y bioquímicos

Variable	Expresión hepática de SFRP5	
	mRNA	Proteína
Edad	0.003 (0.982)	0.008 (0.956)
IMC	0.045 (0.753)	-0.093 (0.512)
Glucosa	-0.196 (0.177)	-0.135 (0.349)
Insulina	-0.230 (0.116)	0.214 (0.136)
HOMA-IR[†]	-0.207 (0.168)	0.195 (0.189)
Triacilglicéridos	-0.207 (0.146)	0.050 (0.721)
Colesterol total	0.072 (0.615)	0.130 (0.353)
C-HDL	0.225 (0.112)	-0.096 (0.496)
C-LDL	0.077 (0.589)	0.229 (0.099)
AST	-0.145 (0.314)	-0.202 (0.152)
ALT	-0.116 (0.424)	-0.437[~] (0.001)
GGT	-0.200 (0.164)	-0.287* (0.037)
Leptina sérica	0.142 (0.336)	0.025 (0.863)
Adiponectina sérica	0.054 (0.714)	0.028 (0.845)

Los datos representan el coeficiente de correlación de Spearman y entre paréntesis está el valor de significancia. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; C-HDL, colesterol HDL; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transferasa. †Análisis solo sin DT2. *P<0.05.

6.4.3 Asociación de la expresión hepática de SFRP5 con el HGNA

Interesantemente, las concentraciones hepáticas del mRNA y proteína SFRP5 correlacionaron negativa y significativamente con el contenido hepático de triacilglicéridos ($r = -0.349$, $P = 0.016$ y $r = -0.291$, $P = 0.040$; Figura 13 a-b). Es decir, conforme las concentraciones hepáticas de SFRP5 disminuyeron, el contenido hepático de triacilglicéridos aumentó. Asimismo, la expresión hepática de SFRP5 incrementada (mRNA y proteína) también se asoció con un menor grado de esteatosis hepática. La expresión del mRNA de SFRP5 disminuyó un 44.4% y las concentraciones de la proteína un 33.4%, en las mujeres con esteatosis grado 3 en comparación con aquellas sin esteatosis (Figura 14a-b).

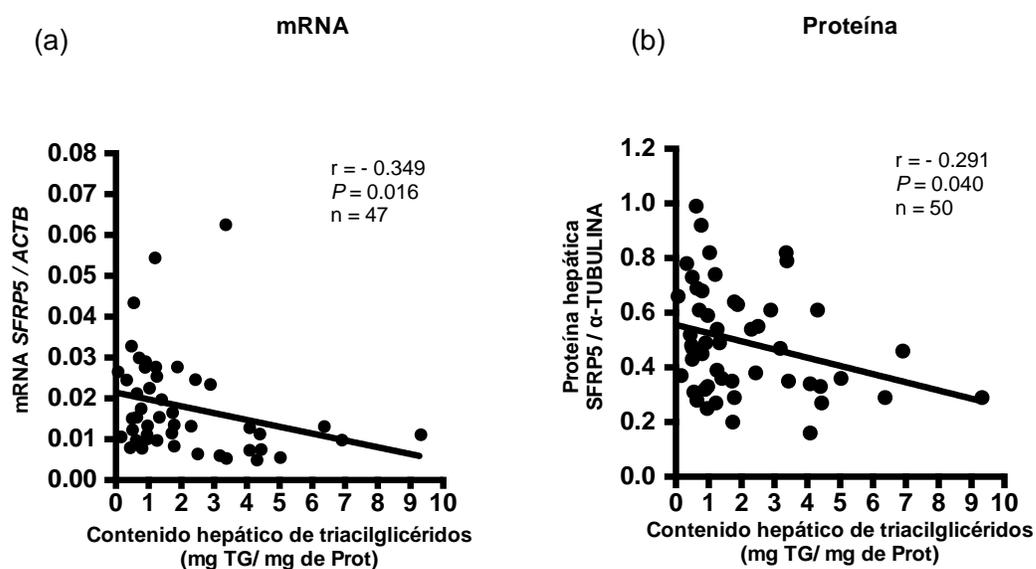


Figura 13. Correlación de la expresión hepática del mRNA y la proteína SFRP5 con la acumulación de grasa hepática. (a) Correlación de la expresión relativa de SFRP5 (mRNA) con el contenido hepático de triacilglicéridos; (b) Correlación entre las concentraciones hepáticas de la proteína SFRP5 y el contenido hepático de triacilglicéridos.

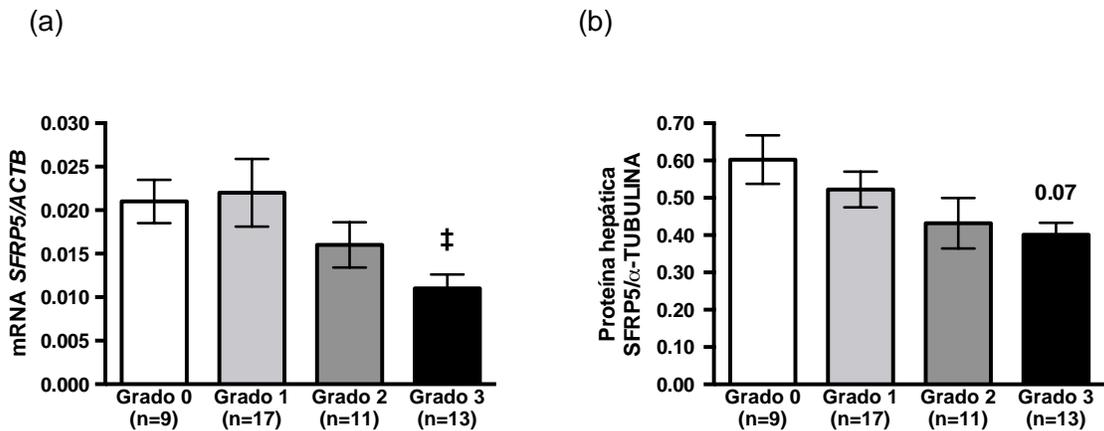


Figura 14. Asociación de la expresión hepática del mRNA y la proteína *SFRP5* con la acumulación de grasa hepática. (a) Asociación de la expresión relativa de *SFRP5* (mRNA) con el grado de esteatosis; (b) Asociación de las concentraciones hepáticas de proteína *SFRP5* con el grado de esteatosis. Los datos están representados como la media \pm el error estándar. † $P < 0.05$ vs. Grado 0. Ajustados por la presencia de DT2 e hipoglucemiantes.

En la figura 15a se muestra que los niveles hepáticos del mRNA de *SFRP5* disminuyeron conforme aumentó la progresión del HGNA, excepto en las mujeres con EHNA indefinida. El grupo con EHNA mostró una disminución del 38.8% de niveles hepáticos del mRNA de *SFRP5* en comparación con el grupo sin HGNA ($P=0.026$ ajustado por la presencia de DT2 e hipoglucemiantes). De igual manera, las concentraciones hepáticas de la proteína *SFRP5* disminuyeron conforme la progresión del HGNA (Figura 15b). El grupo con esteatosis presentó una disminución de un 5%, EHNA indefinida un 14%, los pacientes con EHNA un 36.9%, comparados con el grupo sin HGNA. Sin embargo, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos sin HGNA vs. EHNA, así como los grupos de esteatosis vs. EHNA ($P=0.017$ y $P=0.006$, ajustado por la presencia de DT2 e hipoglucemiantes, respectivamente).

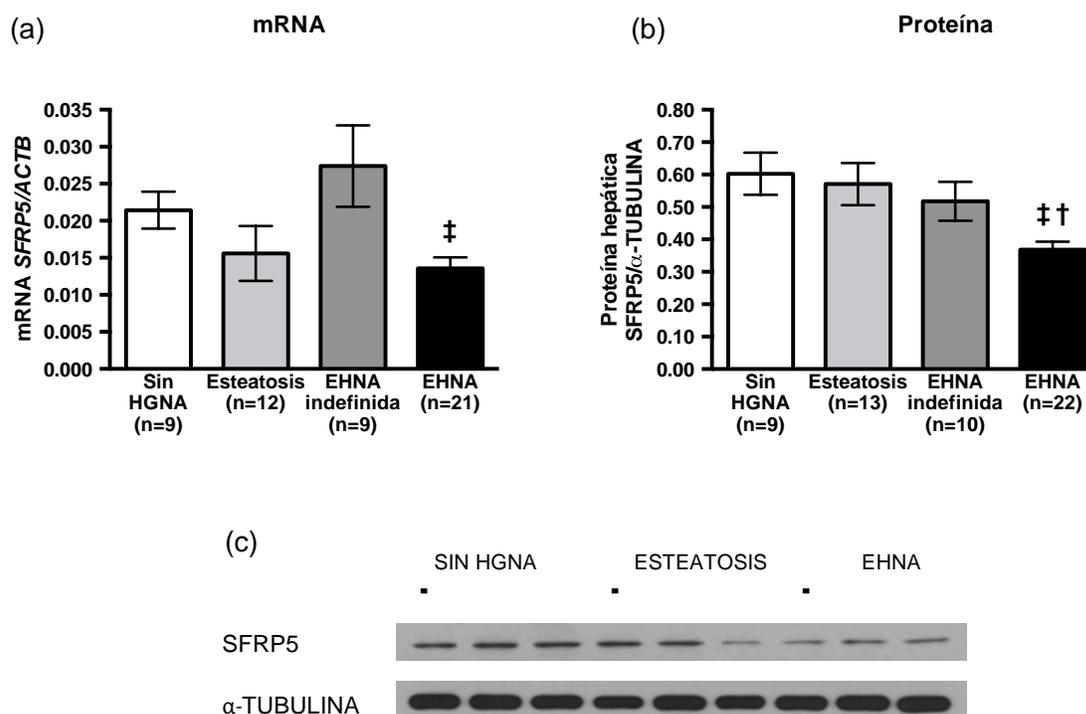


Figura 15. Asociación de la expresión hepática del mRNA y la proteína SFRP5 con el HGNA. (a) Asociación de la expresión relativa de SFRP5 (mRNA) con el HGNA; (b) Asociación de las concentraciones hepáticas de la proteína SFRP5 con el HGNA. [‡] $P < 0.05$ vs. sin HGNA, [†] $P < 0.05$ vs. esteatosis. Ajustados por estatus de DT2 e hipoglucemiantes. (c) Ejemplo representativo del inmunoblot de SFRP5 en el tejido hepático de mujeres: tres sin HGNA, tres con esteatosis y tres con EHNA.

6.4.4 Análisis de patrones de metilación del promotor de SFRP5

Con el fin de conocer si las diferencias de expresión observadas entre el grupo sin HGNA y la EHNA se debían a variación en los patrones de metilación, se evaluaron dos regiones del promotor de SFRP5. Para ello, se obtuvo DNA del tejido hepático de 42 de las 54 muestras en estudio (7 sin HGNA, 8 con esteatosis, 10 con EHNA indefinida y 17 con EHNA). En la figura 16 se muestra un gel representativo de los productos de MSP de mujeres sin HGNA, con esteatosis y EHNA. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al producto de PCR con los oligonucleótidos que identifican las

citocinas no metiladas (U) y el carril 3 corresponde al producto de PCR con los oligonucleótidos que identifican las citocinas metiladas (M). Los carriles 2 y 3 pertenecen al mismo sujeto y así sucesivamente. Con el fin de validar estos ensayos, se empleó DNA comercial alta, media y bajamente metilado (Figura 16). Este análisis mostró que todas las muestras analizadas no presentaron metilación de citosinas en la región de -326 a -191 pb, que pudiera explicar las diferencias en la expresión observadas.

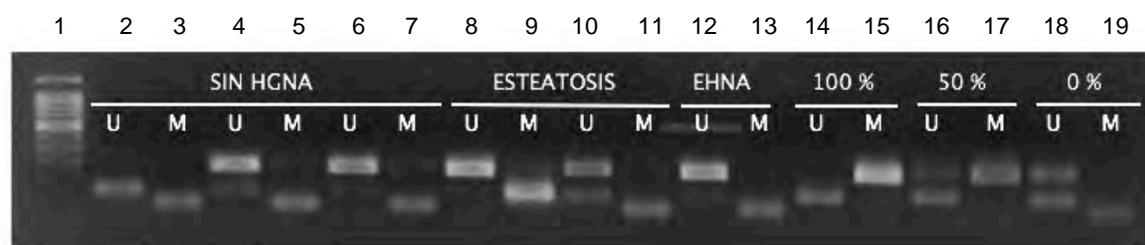
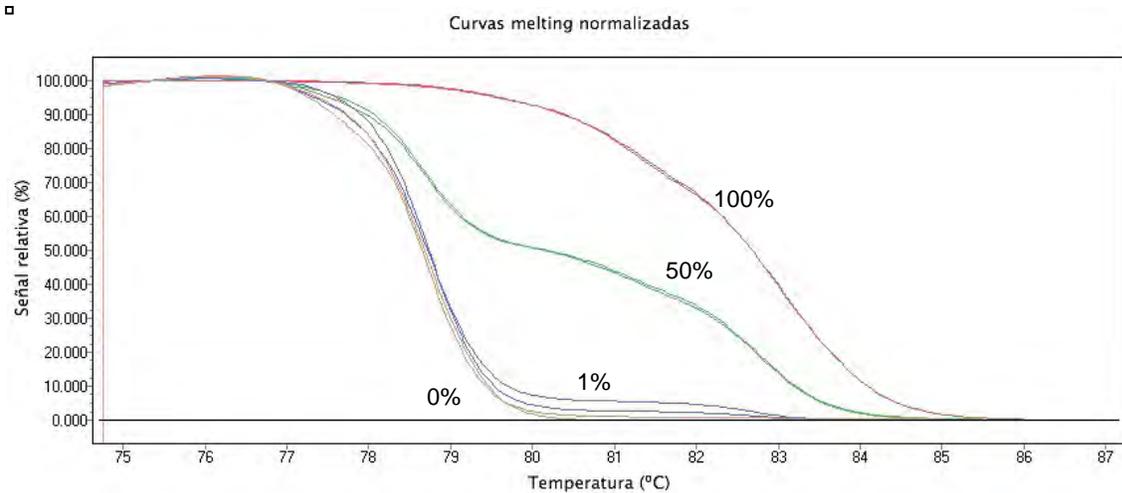


Figura 16. Análisis de metilación de la región -326 a -191 pb del promotor de *SFRP5* por PCR metilación específica en DNA de tejido hepático. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Las bandas en los carriles M son los productos obtenidos con los oligonucleótidos específicos para el producto metilado y las bandas en los carriles U son los productos obtenidos con los oligonucleótidos específicos para el producto no-metilado. El gel incluye 3 sujetos sin HGNA, 2 sujetos de esteatosis y 1 de EHNA. Como control positivo se incluyó un DNA altamente metilado (100%), una mezcla 1:2 de DNA altamente metilado/DNA bajamente metilado (50%) y como control negativo DNA bajamente metilado.

Adicionalmente, la región -150 a -74 pb del promotor de *SFRP5* fue analizada mediante HRM-metilación. La figura 17a muestra las curvas que trazan la amplificación de un DNA altamente metilado (100%, en rojo), una mezcla 1:1 de DNA alta y bajamente metilado (50%, en verde) y un DNA bajamente metilado (1%, en azul y 0%, en negro). La figura 17b muestra las curvas representativas que trazan la amplificación del DNA hepático de los grupos de estudio, observándose que ninguna de las muestras presentó citosinas metiladas en esta región.

(a)



(b)

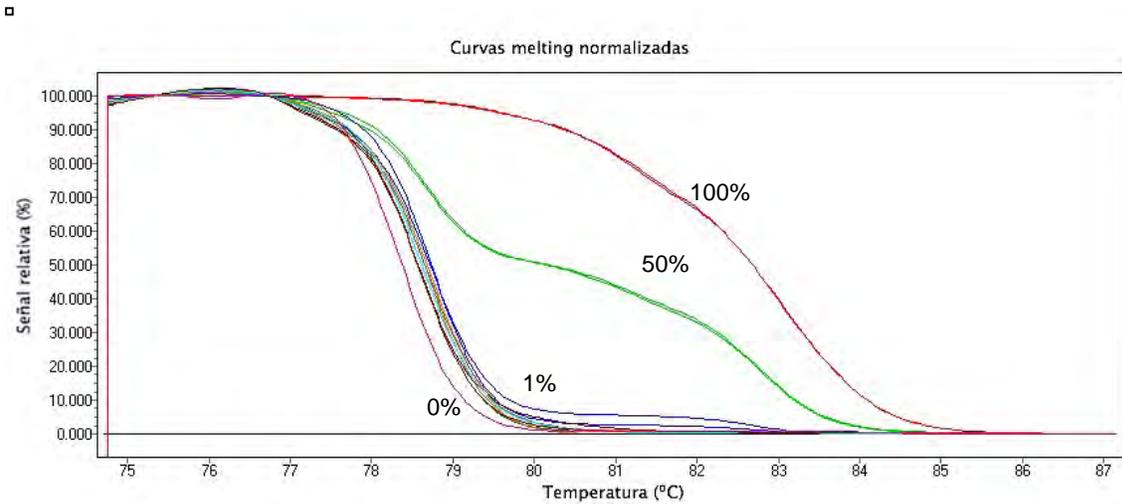


Figura 17. Análisis de metilación de la región de -150 a -74 pb del promotor de *SFRP5* por HRM metilación. (a) Curva estándar de metilación de la región de -150 a -74 pb del promotor de *SFRP5*, 100% metilado (en rojo), 50% metilado (en verde), 1% metilado (en azul) y 0% metilado (en naranja). (b) La misma curva estándar y muestras ejemplo de DNA hepático. Todas las muestras de DNA hepático se encuentran entre 0 a 1% metilado de las mujeres del estudio.

6.4.5 SFRP5 como un factor de riesgo independiente para el HGNA

El análisis de regresión multivariado identificó a la disminución de la concentración de la proteína SFRP5 como un factor independiente para el HGNA. Además, este análisis también mostró otros factores de riesgo para el HGNA, los cuales han sido previamente reportados, como el HOMA-IR, las concentraciones circulantes de ALT, adiponectina y leptina (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de regresión multivariado para predecir el puntaje de actividad del HGNA

Variable	B	SE	P
Diagnóstico de DT2	1.861	0.487	<0.001
HOMA-IR	0.085	0.039	0.034
ALT	2.061	0.819	0.016
Leptina	2.169	0.838	0.013
Adiponectina	-0.185	0.084	0.033
SFRP5 (proteína)	-3.334	1.254	0.011
Constante	3.635	2.310	0.124

El puntaje de actividad de HGNA se obtuvo de la suma del grado de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonamiento hepatocelular (0-2). Las variables en el análisis de regresión multivariado fueron sometidas a un modelo de eliminación atrás para excluir predictores en el modelo. Abreviaturas: B, coeficiente no estandarizado; SE, error estándar del coeficiente no estandarizado; constante, constante del modelo de regresión ;DT2, diabetes tipo 2; HOMA-IR, modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; ALT, alanina aminotransferasa.

6.4.6 Asociación de la expresión hepática de SFRP5 con la fibrosis hepática

Se analizó la asociación de las concentraciones hepáticas de SFRP5 (mRNA y proteína) con la fibrosis hepática. Las mujeres sin fibrosis (F0) exhibieron concentraciones hepáticas más altas de SFRP5 en comparación con aquellas con fibrosis F1+F2 (mRNA: 0.018 ± 0.001 vs. 0.016 ± 0.003 ; y proteína: 0.48 ± 0.03 vs. 0.45 ± 0.03); aunque, ninguna comparación fue significativa ($P > 0.05$).

6.4.7 Vía de señalización de WNT (*WNT5A*), posible relación entre *SFRP5* y el *HGNA*

Dado que una correlación inversa de *Sfrp5* y *Wnt5a* ha sido sugerida como parte del mecanismo de acción de *Sfrp5*, favoreciendo la acumulación de grasa hepática. Sin embargo, este estudio no se observó correlación entre las concentraciones séricas de *SFRP5* y *WNT5A* ($P > 0.05$, Figura 18a). De igual forma, la expresión hepática de *SFRP5* (mRNA y proteína) no correlacionó con la expresión hepática de *WNT5A* (mRNA y proteína) ($P > 0.05$, Figura 18b-c).

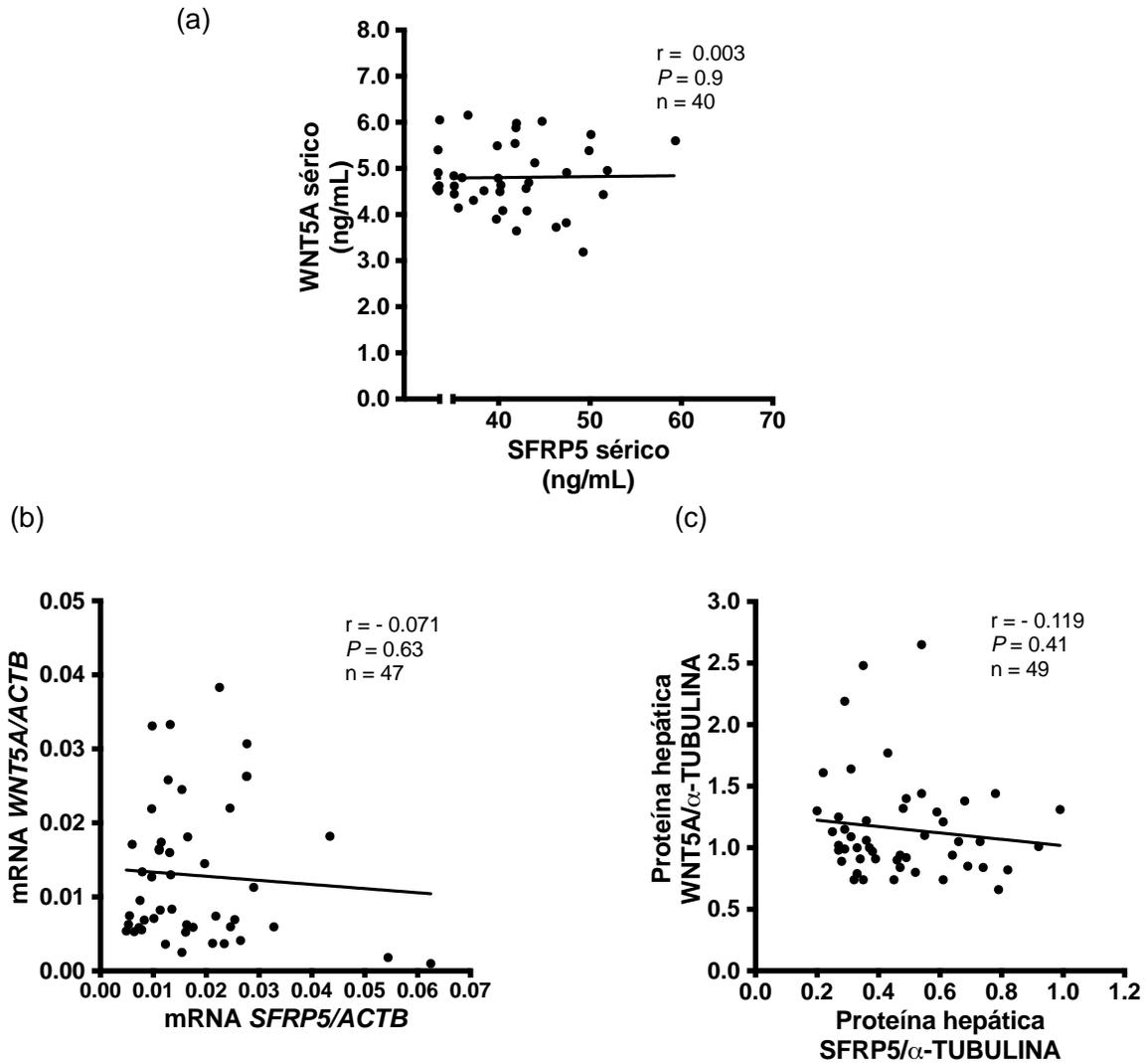


Figura 18. Correlación de las concentraciones de SFRP5 y WNT5A en mujeres con obesidad II/III. (a) Correlación de las concentraciones séricas de SFRP5 y WNT5A; (b) Correlación de los niveles hepáticos del mRNA *SFRP5* y *WNT5A*; y (c) Correlación de las concentraciones hepáticas de las proteínas SFRP5 y WNT5A.

Aun cuando los niveles hepáticos de mRNA de *WNT5A* presentaron un incremento conforme aumentó la progresión del HGNA, éste no fue significativo ($P > 0.05$, Figura 19b). En contraste, las concentraciones circulantes y hepáticas de la proteína de WNT5A fueron semejantes entre las mujeres sin HGNA y los diferentes estadios del HGNA ($P > 0.05$, Figura 19a-c).

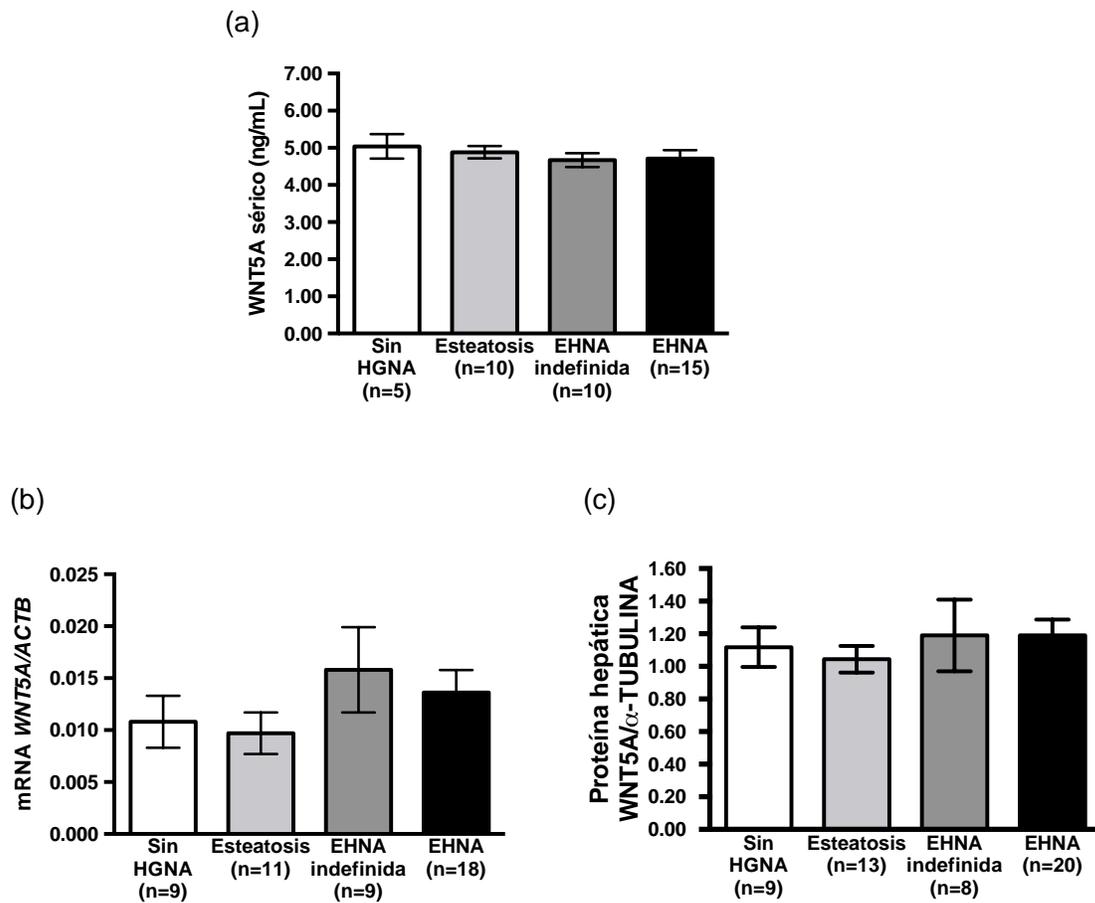


Figura 19. Asociación de las concentraciones séricas y hepáticas de WNT5A con el HGNA. (a) Asociación de las concentraciones séricas con el HGNA ($P > 0.05$); (b) Asociación de los niveles hepáticos del mRNA de *WNT5A* con el HGNA ($P > 0.05$); y (c) Asociación de las concentraciones hepáticas de WNT5A con el HGNA ($P > 0.05$). Los datos están representados como la media \pm error estándar.

6.4.8 Inmunolocalización de SFRP5 en el tejido hepático

Para determinar la localización subcelular de SFRP5 en las biopsias hepáticas, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en 6 muestras de tejido hepático (3 mujeres sin HGNA con las concentraciones hepáticas más altas de SFRP5 y 3 con EHNA con las concentraciones hepáticas más bajas). La figura 20b muestra que SFRP5 fue identificada tanto en el citoplasma como en el núcleo de los

hepatocitos. Adicionalmente, se identificó la proteína de SFRP5 por Western blot en extractos nucleares y citoplasmáticos, confirmando la presencia de SFRP5 en el núcleo y citoplasma de los hepatocitos (Figura 20c).

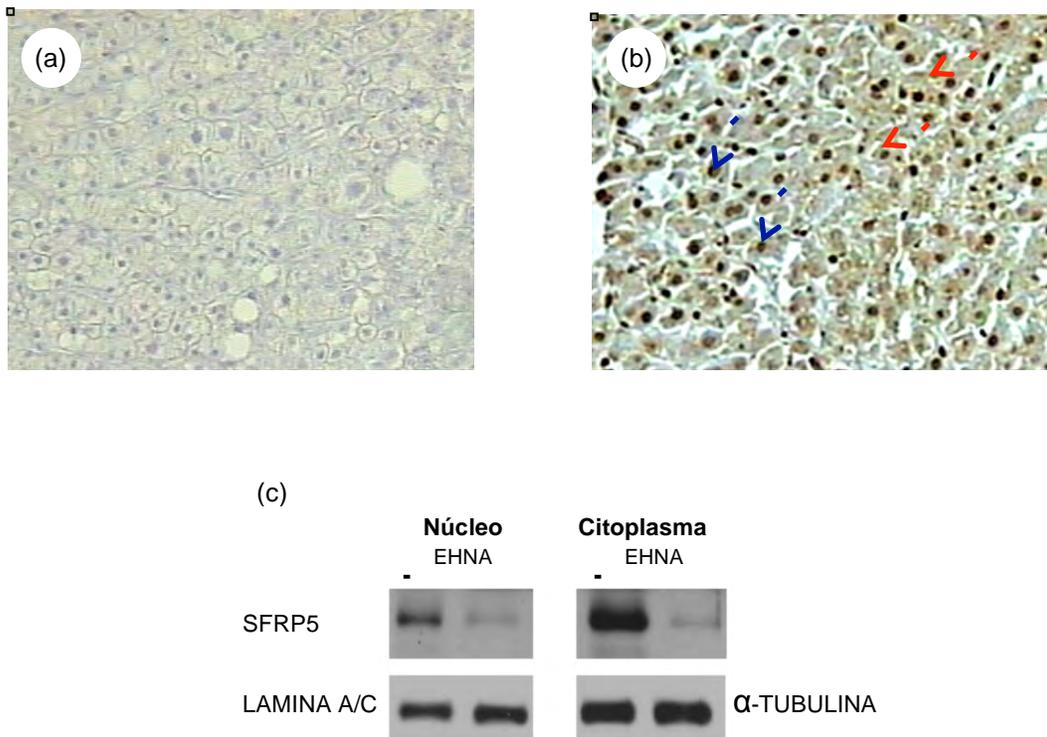


Figura 20. Localización subcelular de SFRP5 en el tejido hepático sin HGNA y con EHNA. (a) Control negativo de la inmunohistoquímica de SFRP5; (b) Inmunohistoquímica de SFRP5 en tejido hepático, muestra numerosos hepatocitos con fuerte inmunoreactividad en el núcleo y en el citoplasma (tinción café). La flechas indican la inmunotinción de SFRP5 en el núcleo (en azul) y en el citoplasma (en rojo). Una muestra representativa de un sujeto sin HGNA. (200x magnificación); (c) Dos muestras representativas del inmunoblot de SFRP5 en fracción nuclear y citoplasmática de tejido hepático de dos sujetos con EHNA.

Dado estos hallazgos, se realizaron dos análisis *in silico* para determinar si SFRP5 presenta secuencias de localización nuclear. El primer análisis predijo la presencia de 5 posibles secuencias de localización nuclear: KKKK en 225 (respecto a la posición del primer aminoácido), PGPLKRK en 232, PLKRKDT en 234, KKKKLLKPGPLKRKDTK en 225 y KKKLLKPGPLKRKDTKR en 226

(PSORTII). Mientras que el segundo análisis *in silico* mostró que SFRP5 puede localizarse en el núcleo y en el citoplasma (cNLSMapper).

6.4.9 Análisis de expresión génica global mediante microarreglos en tejido hepático

Se evaluó la expresión génica global en el hígado de mujeres con concentraciones hepáticas de SFRP5 bajas (tercil 3; n=6) y altas (tercil 1, n=6). Los resultados de la expresión génica global entre los grupos de contraste se muestran en la gráfica de Volcán (Figura 21). Los genes diferencialmente expresados fueron seleccionados con un corte arbitrario de veces de cambio ≤ -2.0 (log veces de cambio ≤ -1) para genes sub-expresados y veces de cambio ≥ 2.0 (log veces de cambio ≥ 1) para los genes sobre-expresados y con un valor de significancia ≤ 0.05 . Con estos criterios se identificaron 13 genes diferencialmente expresados (puntos en azul), de los cuales 5 presentaron una expresión menor en las mujeres del tercil 1 que en las del tercil 3 (sub-expresados), y 8 genes mostraron una expresión mayor en las mujeres del tercil 1 en comparación con las del tercil 3 (sobre- expresados) (Figura 21).

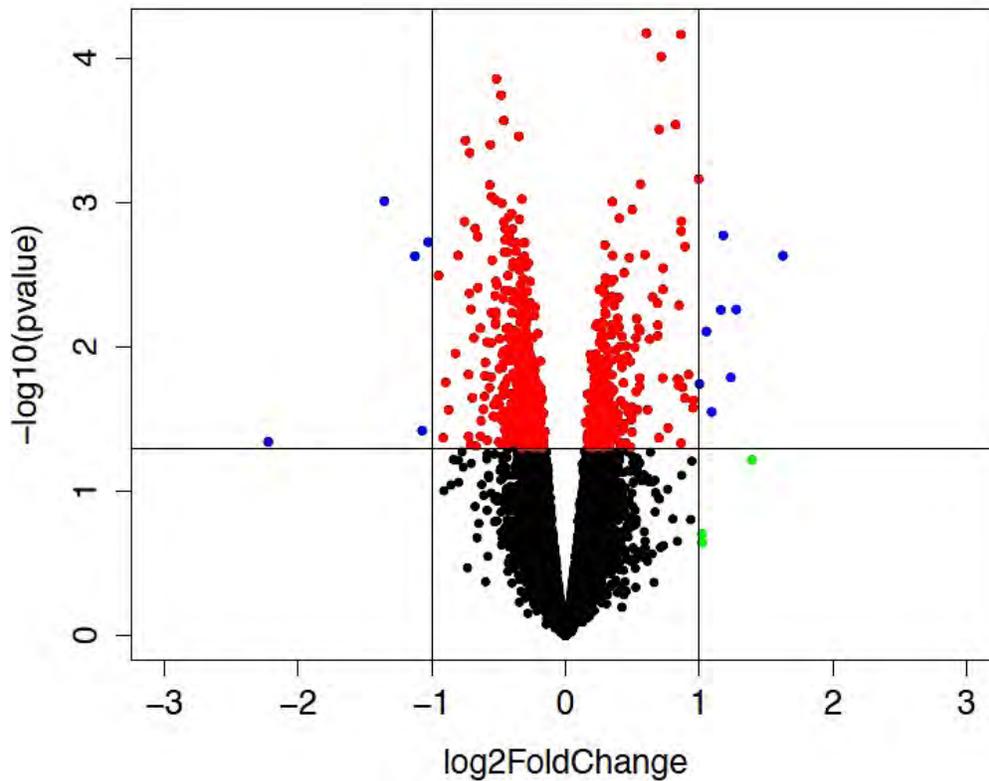


Figura 21. Gráfica de volcán de la expresión génica global entre las mujeres del tercil 1 y 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5. En el eje de las “x” se gráfica el Log_2 veces de cambio y en el eje de las “y” se gráfica el $-\text{Log}_{10}$ valor de P. Las líneas verticales representan los cortes del Log_2 veces de cambio >1 o Log_2 veces de cambio -1 , y la línea horizontal indica un valor de significancia de 0.05. Los puntos negros representan genes con un $1- > \text{Log}_2$ veces de cambio < 1 y con una $P < 0.05$, los puntos verde $1- < \text{Log}_2$ veces de cambio > 1 y una $P > 0.05$; y los puntos azules representan los genes diferencialmente expresados con un valor Log_2 veces de cambio < -1 (sub-expresados, a la izquierda) y Log_2 veces de cambio > 1 (sobre-expresados, a la derecha).

En la tabla 8 se muestra la lista de los 13 genes diferencialmente expresados. De manera interesante, se observa que las concentraciones hepáticas disminuidas de la proteína SFRP5 están asociadas con niveles sub-expresados de *GSTM1* y *GSTA1*, dos enzimas importantes en la detoxificación de compuestos electrófilos incluyendo productos del estrés oxidante; así como con niveles sobre-expresados de miR-21, *GPX* y la citocina pro-inflamatoria *CXCL8* (*IL-8*).

Con estos 13 genes se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando los programas: INGENUITY PATHWAY ANALYSIS y DAVID. Estos análisis ubicaron a los genes diferencialmente expresados en 5 vías de señalización, incluidas la detoxificación mediada por glutatión y respuesta al estrés mediado por NRF2 (Factor nuclear respiratorio 2) (Tabla 9). Además, el análisis de enriquecimiento también identificó la participación de los genes diferencialmente expresados en la citotoxicidad de distintos tejidos, incluyendo el hígado ($P=1.39 \times 10^{-5}$). En la tabla 9 se muestra con mayor detalle las alteraciones que conciernen a la hepatotoxicidad.

Tabla 8. Genes sub- y sobre-expresados en las mujeres del tercil 1 en comparación con las del tercil 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5.

	Nombre del gen/ símbolo oficial	Función	Veces de cambio	P
SUB-EXPRESADOS	<i>Glutathione S-transferase mu1/ GSTM1</i>	Involucrada en la detoxificación de compuestos electrófilos, incluidos carcinogénicos, fármacos, toxinas y productos del estrés oxidante.	-4.7	4.0 x10 ⁻²
	Solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 1/ <i>SLC3A1</i>	Transportador de aminoácidos neutros y básicos en el túbulo renal y tracto intestinal.	-2.6	9.0 x10 ⁻⁵
	Villin1/ <i>VIL1</i>	Es un miembro de la familia de proteínas de unión a actina dependiente de calcio. Se encuentra en el citoesqueleto del borde de cepillo que funciona para la nivelación, cortado y agrupación de los filamentos de actina.	-2.2	2.3 x10 ⁻³
	UDP glucuronosyl transferase 2 family, polypeptide A1/ <i>UGT2A1</i>	Conjuga sustratos lipofílicos con ácido glucurónico para incrementar su solubilidad y favorecer su excreción.	-2.1	3.8 x10 ⁻²
	Glutathione S-transferase alpha2/ <i>GSTA2</i>	Involucrada en la detoxificación de compuestos electrófilos, incluidos carcinogénicos, fármacos, toxinas y productos del estrés oxidante. Además, su actividad de peroxidasa protege a las células de ROS y productos de peroxidación.	-2.0	1.9 x10 ⁻³
SOBRE-EXPRESADOS	VAULT RNA 1-1/ <i>VNTRNA1-1</i>	Es una ribonucleoproteína citoplasmática	3.1	2.3 x10 ⁻³
	Mepirin A, beta/ <i>MEP1B</i>	Metaloproteasa involucrada en la hidrólisis de péptidos y proteínas.	2.4	5.0 x10 ⁻³
	Serine peptidase inhibitor, Kazal type I/ <i>SPINK1</i>	Inhibidor de tripsina que previene la activación prematura de zimógenos mediada por la acción de la tripsina	2.4	1.6 x10 ⁻²
	Epithelial membrane protein 1/ <i>EMP1</i>	Involucrada en el crecimiento celular y en el desarrollo celular del epitelio	2.3	1.6 x10 ⁻³
	<i>RNU4-2</i>	No descrita	2.2	5.5 x10 ⁻³
	Chemokine (C-X-C motif) ligando 8/ <i>CXCL8</i>	Quimiocina mediadora en la respuesta inflamatoria. Su función es quimioatrayente y es un potente agente angiogénico.	2.1	2.8 x10 ⁻²
	Glutathione peroxidase 2/ <i>GPX2</i>	La enzima glutatión peroxidasa (dependiente de selenio) cataliza la reacción de oxidación del glutatión utilizando peróxido de hidrógeno en el epitelio del tracto gastrointestinal.	2.1	7.8 x10 ⁻³
	microRNA 21/ <i>miR-21</i>	Regulador de la señalización de TGF-β y fibrogénesis	2.0	1.8 x10 ⁻²

Base de datos: Gene en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Abrev.; P, valor de significancia de t-Student.

Tabla 9. Análisis de enriquecimiento de vías de señalización y hepatotoxicidad de los genes diferencialmente expresados en las mujeres del tercil 1 en comparación con las del tercil 3 de las concentraciones hepáticas de SFRP5.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO	P
- Vías de señalización	
Destoxificación mediada por glutatión	1.15x10 ⁻⁴
Respuesta al estrés oxidante mediado por NRF2	1.78x10 ⁻⁴
Señalización de metabolismo de xenobióticos	5.27x10 ⁻⁴
Activación de PXR/RXR (Receptor nuclear X de pregnano/receptor X retinoide)	7.39x10 ⁻⁴
Señalización del receptor aril hidrocarburo	3.33x10 ⁻³
- Hepatotoxicidad	
Disminución de glutatión en el hígado	1.39x10 ⁻⁵
Colestasis hepática	6.48x10 ⁻⁵
Carcinoma hepatocelular	3.22x10 ⁻⁴
Hiperplasia en hígado	5.91x10 ⁻⁴
Inflamación en hígado/hepatitis	1.39x10 ⁻²

El análisis de enriquecimiento se realizó con los software INGENUITY PATHWAY ANALYSIS y Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery. *P*, valor de significancia.

7. DISCUSIÓN

El HGNA ha sido considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico, cuya frecuencia incrementa con el grado de obesidad [1], alcanzado una prevalencia de hasta un 95% en sujetos con obesidad mórbida [7–10]. La población de mujeres mexicanas participantes en este estudio, presentó una frecuencia elevada de HGNA y de EHNA (83.3 y 40.7%, respectivamente), similar a la observada en diversos estudios con sujetos con obesidad mórbida [7–10].

En los últimos años, el estudio del HGNA ha sido de gran interés debido a su creciente prevalencia. Estudios en modelos animales y en humanos han identificado a la secreción alterada de adipocinas como un mecanismo involucrado en la patogenia del HGNA [45,67,102]. Además, las concentraciones de estas adipocinas han sido consideradas como posibles biomarcadores del HGNA y como potenciales blancos terapéuticos para esta enfermedad [112,113]. A la fecha se han caracterizado diversas adipocinas asociadas con el desarrollo del HGNA, las más estudiadas son la leptina y adiponectina ya que son producidas exclusivamente por el tejido adiposo [43]. Las concentraciones incrementadas de leptina y disminuidas de adiponectina se han asociado con un riesgo elevado a desarrollar HGNA en poblaciones caucásicas [45,47,50,53,55–57]. Sin embargo, las adipocinas descritas hasta el momento no explican por completo la participación del tejido adiposo, por lo que otras adipocinas podrían participar de manera importante en el desarrollo del hígado graso. En este sentido, se identificó

recientemente a Sfrp5 como la segunda adipocina anti-inflamatoria en un modelo de obesidad en el ratón [83]. Sin embargo, su participación en el desarrollo del HGNA en humanos aun ha sido poco evaluada. Por ello, en el presente estudio se analizó la participación de SFRP5 en el desarrollo y progresión del HGNA en una población de mujeres con obesidad grado II/III, y se comparó con las adipocinas adiponectina y leptina, previamente asociadas con el HGNA [55,64–67].

Para una mejor discusión de los resultados obtenidos, se inicia con las adipocinas asociadas al HGNA descritas en la literatura, y posteriormente, se discuten los resultados de SFRP5.

Participación de las adipocinas adiponectina y leptina en el HGNA

Las concentraciones séricas de adiponectina correlacionaron positivamente con las HDLs circulantes y negativamente con las concentraciones de triacilglicéridos, consistente a lo reportado en sujetos con obesidad mórbida [114–118]. Estudios en modelos murinos han mostrado que el aumento de la concentración de adiponectina incrementa la producción de C-HDL, ya que promueve la síntesis hepática de apoA-I, la principal apolipoproteína de las HDL. Además, la adiponectina favorece la expresión de *ABCA1* mediante la activación de los receptores LXR y PPAR γ , reduce la secreción hepática de apoB-100 y VLDL, consistente con la correlación negativa observada con las concentraciones de triacilglicéridos [119–122].

De manera interesante, se observó una correlación negativa entre las concentraciones séricas de adiponectina y el contenido hepático de triacilglicéridos, consistente con las concentraciones de adiponectina más bajas asociadas con un grado mayor de esteatosis y con EHNA, sugiriendo la participación de esta adipocina en la acumulación ectópica de lípidos en el hígado y en el establecimiento de la EHNA [50,63,67,102,123–125]. La hipoadiponectinemia podría ser un mecanismo clave en el desarrollo del HGNA, ya que podría asociarse a una deficiente activación de AMPK y PPAR α en el hígado, y en consecuencia, la pérdida de la regulación del metabolismo energético [76,77]. En modelos animales se ha reportado que la hipoadiponectinemia precede a la disminución de la expresión hepática de *Adipor2* [126]. Por ello, el presente estudio evaluó su expresión, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sin HGNA, esteatosis simple y esteatohepatitis. Estos hallazgos son congruentes con la falta de consistencia observada en la variación de la expresión hepática de *ADIPOR2* en el HGNA [115,123,127–130]. Dos estudios han reportado una disminución de la expresión hepática de *ADIPOR2* en sujetos con EHNA [127,128]. En contraste, otros estudios han reportado un aumento o ausencia de diferencias significativas [115,123,129,131]. Por lo tanto, la hipoadiponectinemia es el único hallazgo observado de manera constante en sujetos con HGNA, pero aun falta por identificar los mecanismos relacionados con la adiponectina involucrados en el desarrollo del HGNA. Por otro lado, se ha propuesto que la hipoadiponectinemia puede deberse, en parte, al incorrecto ensamblaje y/o secreción de la adiponectina, ya sea por la presencia de

variantes en el gen *ADIPOQ*, estrés de retículo endoplasmático, estrés oxidante y disfunción mitocondrial [132–134].

A diferencia de lo observado en la adiponectina y en consistencia con algunos estudios previos [122,135,136], las concentraciones séricas de leptina no mostraron asociación significativa con el grado de esteatosis, ni correlación con el contenido hepático de triacilglicéridos. En contraste, al menos cuatro estudios han reportado concentraciones elevadas de leptina sérica como factor de riesgo del HGNA [55,64,65,137]. La hiperleptinemia es frecuente en los sujetos con HGNA. Sin embargo, esto es paradójico por sus efectos sobre el metabolismo de lípidos, ya que la leptina disminuye la síntesis de AG mediante la inhibición de la enzima acetil-CoA carboxilasa y estimula la oxidación de los AG vía el receptor PPAR α [72]. Esta paradoja ha sido explicada, en parte, por la presencia de la resistencia a la leptina en el HGNA. Los mecanismos sugeridos para explicar esta condición incluyen el transporte defectuoso de la leptina a través de la barrera hematoencefálica, disminución de la señalización de la leptina, variantes del gen *LEP* y *LEPR*, así como el estrés del retículo endoplasmático [70,71], el cual inhibe la acción de leptina mediante la fosforilación de STAT3 [138].

La falta de asociación de la leptina con el HGNA en este estudio puede deberse a las características de la población estudiada como el grado de obesidad de las integrantes, la presencia de diabetes y la resistencia a la insulina [66].

Por otro lado, la falta de asociación significativa de la fibrosis hepática con las concentraciones séricas de las adipocinas, puede deberse al número reducido

de mujeres con fibrosis en la población estudiada.

Participación de SFRP5 en el HGNA

Aun cuando el tejido adiposo secreta diversas adipocinas, la adiponectina se considera como la única adipocina anti-inflamatoria en humanos. Sin embargo, un estudio reciente en un modelo murino identificó a Sfrp5 como una citocina anti-inflamatoria secretada por el tejido adiposo, asociada con el desarrollo de hígado graso en este modelo [83]. Por lo tanto, en este estudio se evaluó su participación en el HGNA en un grupo de mujeres con obesidad grado II/III.

De manera interesante, las concentraciones séricas de SFRP5 correlacionaron positivamente con las concentraciones de adiponectina circulante y negativamente con las concentraciones de leptina sérica y el cociente LAR, consistente con estudios previos que sugieren efectos anti-inflamatorios de SFRP5 [84,86].

A diferencia de lo observado con las concentraciones séricas de adiponectina, SFRP5 circulante no correlacionó con el contenido hepático de triacilglicéridos, ni se asoció con la esteatosis hepática o esteatohepatitis. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Catalán y cols. [139], sugiriendo que a diferencia de adiponectina sérica, SFRP5 circulante no es un biomarcador del HGNA [66,67].

Por otra parte y en contraste con lo observado en el modelo murino de obesidad [83], la expresión de *SFRP5* (mRNA y proteína) en tejido adiposo humano fue muy baja o incluso indetectable. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Ehlund y cols. (2013), quienes observaron niveles de mRNA de *SFRP5* muy bajos en tejido adiposo humano. Además, estos autores demostraron que los adipocitos del humano no secretan de manera activa a *SFRP5*. Por lo tanto, se sugiere que a diferencia de lo observado en el modelo de ratón, donde el tejido adiposo es clave en su secreción [88], en el humano, otros tejidos podrían ser de mayor relevancia en la expresión de *SFRP5*. En este sentido, estudios en carcinoma hepatocelular han identificado a *SFRP5* como un importante factor en el desarrollo de este cáncer, ya que su silenciamiento mediante hipermetilación de su promotor condiona a carcinoma hepatocelular [92,93].

De manera interesante, la expresión *SFRP5* en el hígado fue significativamente mayor que la presentada por el tejido adiposo en la población de mujeres con obesidad. Estos resultados sugieren que a diferencia de lo observado en los modelos murinos, en humanos el tejido adiposo no es el órgano principal para la expresión de *SFRP5* [83]. Dada la abundancia de *SFRP5* en el hígado y su posible importancia en el funcionamiento del mismo, se evaluó la asociación de la expresión de *SFRP5* con el HGNA. Las concentraciones hepáticas del mRNA y la proteína *SFRP5* correlacionaron con un mayor contenido hepático de triacilglicéridos. Estos hallazgos son consistentes a lo reportado por Ouchi y cols., quienes observaron un mayor contenido hepático de triacilglicéridos

en ratones deficientes de *Sfrp5* alimentados con una dieta obesogénica [83]. Además, nuestros resultados mostraron que las concentraciones hepáticas del mRNA y la proteína SFRP5 fueron significativamente más bajas en las mujeres con esteatohepatitis en comparación con aquellas sin HGNA. Estos hallazgos sugieren que la concentración hepática de la proteína SFRP5 es un factor de riesgo para el HGNA, independiente de las concentraciones séricas de adiponectina, las cuales han sido reportadas como un factor predictor de riesgo de HGNA [50,63,67].

La regulación de la expresión génica de *SFRP5* se ha estudiado ampliamente mediante la metilación de citocinas en su promotor, ya que la hipermetilación de su promotor provoca el silenciamiento de este gen, el cual ha sido reportado en varios tipos de cáncer incluido el carcinoma hepatocelular [87,92,93]. Dada las diferencias de expresión del mRNA de *SFRP5* entre los grupos sin HGNA y EHNA, se analizaron patrones de metilación en la región de -326 a -191 pb, hipermetilada en casos de carcinoma hepatocelular [87,92] y en la región de -150 a -74 pb, no observándose patrones de metilación que expliquen dichas diferencias. Sin embargo, debido a que la isla CpG del promotor tiene una longitud de 930 pb y solo se evaluó una parte de esta región, la metilación en otras regiones no puede ser descartada como un mecanismo de regulación de la expresión de *SFRP5* en el HGNA.

El mecanismo de acción propuesto para *Sfrp5* en el desarrollo del HGNA

implica la regulación de la vía de Wnt al secuestrar a Wnt5a, lo que evita su unión al receptor Frizzled. De lo contrario, la unión de Wnt5a con su receptor Frizzled genera la transducción de señales de vía de Wnt, que desencadena a la activación de Jnk-1, y en consecuencia la resistencia a la insulina mediante la fosforilación de residuos de serina del sustrato del receptor de la insulina 1 [83]. En el presente estudio no se observó correlación entre las concentraciones de SFRP5 y WNT5A (en suero, mRNA o de proteína). Además, las concentraciones de WNT5A (suero, mensajero y proteína) tampoco se asociaron con el HGNA. Estos hallazgos no son consistentes con lo publicado por Catalán y cols.(2014), quienes reportaron una asociación de las concentraciones circulantes de WNT5A con el HGNA [139]. Esta falta de consistencia podría ser explicada, en parte, por diferencias en el diseño de los estudios, ya que el presente trabajo sólo incluyó mujeres. Por otra parte, el uso de tratamientos hipoglucemiantes en 24% de nuestra muestra, podría influir en las concentraciones de SFRP5 y WNT5A, como ha sido previamente reportado [84,140]. Sin embargo, al excluir del análisis las mujeres con hipoglucemiantes, los resultados fueron semejantes a lo observado en toda la muestra, sugiriendo que el tratamiento farmacológico no es un confusor importante en nuestro estudio.

Estudios genéticos han sugerido que SFRP5 podría participar en diversos procesos de manera independiente de la vía de señalización de WNT [141], lo cual podría ser relevante para dilucidar su participación a nivel hepático en la patogenia del HGNA. La identificación de secuencias de localización nuclear en SFRP5 *in silico* y la confirmación de su presencia en núcleo y citoplasma de hepatocitos por

inmunohistoquímica e inmunoblot, sugiere que SFRP5 pueda tener funciones intracelulares. Para determinar vías de señalización que se asocien con la variación de la concentración hepática de SFRP5, se realizó un análisis de contraste de la expresión génica global en biopsias de tejido hepático de las mujeres que presentaron las concentraciones hepáticas más altas y más bajas de la proteína SFRP5. A través de esta estrategia se identificaron 5 genes sub-expresados y 8 genes sobre-expresados. El análisis de enriquecimiento de los 13 genes diferencialmente expresados evidenció 5 vías metabólicas/señalización que se asocian con cambios en la expresión hepática de SFRP5, las cuales se han asociado con el HGNA.

El análisis de contraste mostró que las mujeres con concentraciones hepáticas más bajas de SFRP5 presentaron una disminución en la expresión de *GSTM1* y *GSTA2* (sub-expresados), pero un incremento de *GPX2* (sobre-expresado) en hígado, los cuales codifican enzimas que participan en la detoxificación de compuestos electrófilos incluidas las ROS [142–144]. Estos hallazgos sugieren que concentraciones bajas de la proteína SFRP5 coexisten con la presencia de estrés oxidante, debida a una menor expresión hepática de las enzimas *GSTM1* y *GSTA2* que conjugan productos tóxicos como las ROS con el glutatión, para proteger al hígado de sus efectos tóxicos [145]. Las isoformas de GST se dividen en varias familias incluidas la alfa y Mu, las cuales tienen múltiples miembros. En conjunto estas isoformas disminuyen al estrés oxidante inducido por peróxidos de lípidos [146]. De igual forma, el incremento de la expresión del gen *GPX2* podría reflejar el estrés oxidante presente en las mujeres del tercil 1,

considerando que este gen codifica para una enzima, cuya función es oxidar glutatión a expensas de peróxido de hidrógeno [144].

Por otra parte, el análisis de enriquecimiento identificó vías de señalización mediadas por NRF2, PXR/RXR y el receptor aril hidrocarburo; debido a que *GSTM1*, *GSTA2* y *GPX2* son regulados por estos factores de transcripción. El factor de transcripción NRF2 es un regulador positivo de la expresión de genes involucrados en la protección contra el estrés oxidante, pero negativo de genes que promueven la esteatosis hepática [147]. Estudios genéticos han identificado la participación de Nrf2 en la patogénesis del HGNA, ya que animales deficientes de Nrf2 sometidos a dietas obesogénicas son más susceptibles de acumular grasa hepática [145]. En relación a los factores de transcripción PXR/RXR y el receptor aril hidrocarburo, un incremento en su expresión también se asocia con una acumulación mayor de grasa hepática [148,149]. El mecanismo que se ha sugerido para explicar lo anterior, se basa en que la activación de estos factores se asocia con un aumento en la expresión hepática de enzimas lipogénicas, pero una disminución de enzimas de la β -oxidación [150].

Estos hallazgos sugieren que las concentraciones bajas de la proteína de SFRP5 coexisten con la variación de la expresión de genes involucrados en el estrés oxidante, el cual ha sido descrito como uno de los mecanismos más importantes para explicar la progresión de esteatosis a esteatohepatitis [66].

Por otro lado, las mujeres con concentraciones hepáticas bajas de la proteína SFRP5 presentaron sobre-expresión de otros genes asociados al desarrollo del HGNA como la citocina pro-inflamatorias *IL-8*, la metaloproteasa *MEP1B*, el regulador de metaloproteasas (1,3,8,9 y 13) *SPINK1* y el microRNA *miR-21*.

IL-8 es una quimiocina atrayente de neutrófilos y un aumento en su expresión se ha asociado con la progresión de EHNA [63,151]. Consistente con la presencia del infiltrado inflamatorio en los lóbulos hepáticos en la EHNA, el cual está compuesto por neutrófilos, granulocitos y linfocitos [17]. Por otra parte, *MEP1B* favorece la secreción de citocinas pro-inflamatorias mediante proteólisis, e.g. *IL-18* e *IL-1 β* , lo que promueve el estado inflamatorio de la EHNA [152]. *SPINK1* es una anti-proteasa principalmente contra tripsinógeno pancreático, pero también se ha sugerido que es una proteína de fase aguda en el proceso inflamatorio, ya que la inflamación inducida por citocinas incrementa su expresión en el hígado [153].

De manera interesante, las concentraciones séricas aumentadas de *miR-21* se han correlacionado con un incremento en el grado de esteatosis, inflamación hepática y fibrosis [154,155]. Más aun, *miR-21* se une específicamente a la región 3'-UTR del mRNA del gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), lo que induce su degradación. Existen numerosas evidencias que indican la participación de *PTEN* en el desarrollo del HGNA. El ratón knock-out tejido específico hepático de

Pten desarrolla esteatosis y esteatohepatitis, y se caracteriza por una expresión incrementada de enzimas lipogénicas como sintetasa de ácidos grasos y la acetil-CoA carboxilasa [156,157]. Además, la disminución de la expresión de PTEN se ha reportado en sujetos con obesidad que presentan esteatosis y esteatohepatitis [158]. Por lo tanto, las concentraciones hepáticas bajas de SFRP5 están acompañadas de un incremento en la expresión de genes que favorecen un estado inflamatorio en el hígado, y que podría alterar su funcionamiento, y finalmente podrían promover la progresión a EHNA.

Dentro de la lista de genes diferencialmente expresados se encuentran genes con función desconocida en el hígado, como *UGT2A1* que codifica una proteína que forma un complejo proteico involucrado en la conjugación de ácido glucorónico con moléculas odorantes lipofílicas para incrementar su solubilidad, y su subsecuente eliminación en el epitelio olfatorio [159]. En este mismo caso se encuentran los genes *SLC3A1* y *VIL1*. *SLC3A1* es un transportador de aminoácidos básicos (lisina, ornitina y arginina) y cistina en el riñón e intestino [160]. *VIL1* inhibe la muerte celular programada, ya que mantiene la integridad mitocondrial, y esto a su vez inhibe la activación de las caspasa-9 y caspasa-3 en células epiteliales [161]. Dada las funciones descritas hasta el momento sobre estos genes es difícil sugerir un posible mecanismo por el cual participen en el desarrollo y/o progresión del HGNA.

Si bien el perfil de expresión hepático observado se asocia con la variación de la concentración de la proteína SFRP5, es posible que también se asocie con la presencia de la esteatohepatitis. Debido a que la mayoría de las mujeres del tercil 3 de SFRP5 son mujeres sin HGNA (83.3%) y las del tercil 1 son mujeres con EHNA (83.3%). Aun cuando es difícil separar estas variables, cabe destacar que las concentraciones hepáticas disminuidas de SFRP5 coexisten con mecanismos del HGNA como el estrés oxidante y la inflamación [1,2,6].

Las fortalezas de este estudio fueron las siguientes: 1) Contar con biopsias del tejido adiposo y hepático humano; 2) la evaluación histológica de la biopsia hepática; y 3) comparar los resultados de SFRP5 con los de adiponectina y leptina; en conjunto estos resultados nos permitieron analizar con mayor precisión la asociación de SFRP5 con el HGNA.

En resumen, las concentraciones de SFRP5 en el tejido hepático correlacionaron negativamente con un menor contenido de triglicéridos en el hígado y se asociaron con el riesgo a desarrollar esteatohepatitis en mujeres con obesidad grado II/III. De manera interesante, concentraciones hepáticas bajas de SFRP5 coexisten con un perfil de expresión que involucra genes del estrés oxidante y de inflamación hepática

8. CONCLUSIONES

- ❖ A diferencia del modelo de ratón, la expresión del SFRP5 en el tejido adiposo humano es baja, contrastando con una mayor expresión observada en el tejido hepático humano.
- ❖ La disminución en las concentraciones de la proteína de SFRP5 en el hígado pero no en suero, se asoció con la acumulación hepática de triacilglicéridos y con la esteatohepatitis, de manera independiente de las concentraciones séricas de adiponectina, sugiriendo que los mecanismos involucrados en el desarrollo del HGNA asociados con estas citocinas pueden ser distintos. Es importante mencionar, que éste es el primer trabajo que reporta esta asociación.
- ❖ Aun cuando no se observaron diferencias en los patrones de metilación de dos regiones del promotor del gen *SFRP5*, este mecanismo de regulación de la expresión génica no puede ser completamente descartado.
- ❖ Las concentraciones en suero, mRNA y proteína de SFRP5 y WNT5A no se correlacionaron entre ellas. Asimismo, las concentraciones séricas y hepáticas de WNT5A no se asociaron con el HGNA, sugiriendo que la activación de la vía WNT mediante WNT5A no participa en el desarrollo y progresión de esta enfermedad en esta población de estudio.

- ❖ Uno de los hallazgos de mayor relevancia de este estudio fue la identificación de un perfil de expresión asociado con la concentración hepática de la proteína SFRP5, el cual involucra genes participantes en el estrés oxidante e inflamación del tejido hepático, implicados en mecanismos relacionados con el desarrollo del HGNA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:145–171.
2. Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004;8:861–879.
3. de Alwis NMW, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears. *J Hepatol.* 2008;48:S104–S112.
4. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, Banner BF. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 1999;31:421–429.
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc Mayo Clin.* 1980;55:434–438.
6. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology.* 1998;114:842–845.
7. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006;45:600–606.
8. Beymer C, Kowdley KV, Larson A, Edmonson P, Dellinger EP, Flum DR. Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery. *Arch Surg Chic Ill 1960.* 2003;138:1240–1244.
9. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* 2010;51:679–689.
10. Spaulding L, Trainer T, Janiec D. Prevalence of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese subjects undergoing gastric bypass. *Obes Surg.* 2003;13:347–349.
11. Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: An insulin resistance paradox? *Hepatology.* 2009;49:791–801.
12. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy M, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology Baltim Md.* 2004;40:1387–1395.
13. Farrell GC, McCullough AJ, Day CP: What is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), and Why is it Important?, en *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.* Wiley-Blackwell, 2013, pp 1–16.
14. Lizardi-Cervera J, Laparra DIB, Chávez-Tapia NC, Ostos MER, Esquivel MU. Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects. *Rev Gastroenterol México.* 2006;71:453–459.
15. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology Baltim Md.* 2009;49:1017–1044.

16. Nouredin M, Loomba R: Nonalcoholic fatty liver disease. Indications for liver biopsy and noninvasive biomarkers. *Clin Liver Dis.* 2012;1:104–107.
17. Tannapfel A, Denk H, Dienes H-P, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2011;458:511–523.
18. Nalbantoglu ILK, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:9026–9037.
19. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40 Suppl 1:S5–10.
20. Munteanu M, Ratziu V, Morra R, Messous D, Imbert-Bismut F, Poynard T. Noninvasive biomarkers for the screening of fibrosis, steatosis and steatohepatitis in patients with metabolic risk factors: FibroTest-FibroMax experience. *J Gastrointest Liver Dis JGLD.* 2008;17:187–191.
21. Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;3:445–451.
22. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013;48:434–441.
23. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen A-M, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3023–3028.
24. Machado MV, Cortez-Pinto H: Non-alcoholic fatty liver disease. What the clinician needs to know. *World J Gastroenterol.* 2014;20:12956–12980.
25. Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24:695–708.
26. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2052–2059.
27. Capeau J. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab.* 2008;34:649–657.
28. Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1768–1776.
29. Pagliassotti MJ. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr.* 2012;32:17–33.
30. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013;58:1497-1507.
31. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:59–69.
32. Cusi K: Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711–725.e6.

33. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2004;40:475–483.
34. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43:S99–S112.
35. Ong JP, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, Goodman Z, Younossi ZM. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2005;15:310–315.
36. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:1513–1517.
37. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet*. 1999;353:1634–1636.
38. Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005;54:303–306.
39. Asrih M, Jornayvaz FR. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol*. 2013;218:R25–R36.
40. Paniagua JA, Escandell-Morales JM, Gil-Contreras D, Berral de la Rosa FJ, Romero-Jimenez M, Gómez-Urbano A, Sanchez-Lopez A, Bellido E, Poyato A, Calatayud B, Vidal-Puig AJ. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. *Nutrition* 2014;30:177–185.
41. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients*. 2015;7:4995–5019.
42. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol*. 2012;205:194–208.
43. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27:163–177.
44. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med Berl Ger*. 2009;87:679–695.
45. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009;50:957–969.
46. Eminler AT, Aygun C, Konduk T, Kocaman O, Senturk O, Celebi A, Gurbuz Y, Halagu S. The relationship between resistin and ghrelin levels with fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Res Med Sci*. 2014;19.
47. Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:1092–1101.
48. Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, Donnini D, Faggian D, Mussap M, Plebani M, Avellini C, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1081–1086.

49. Seo YY, Cho YK, Bae J-C, Seo MH, Park SE, Rhee E-J, Park C-Y, Oh K-W, Park S-W, Lee WY. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinol Metab.* 2013;28:41–45.
50. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40:46–54.
51. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kasumoto K, Makamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2006;26:39–45.
52. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Saito T, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut.* 2006;55:415–424.
53. Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Umemura, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. Blockade of IL-6 signaling exacerbates liver injury and suppresses antiapoptotic gene expression in methionine choline-deficient diet-fed db/db mice. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2011;91:609–618.
54. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F: Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol WJG* 2012;18;727–735.
55. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009;2009:831670.
56. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158–1163.
57. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song X y Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;37:343–350.
58. Zou CC, Liang L, Hong F, Fu JF, Zhao ZY. Serum Adiponectin, Resistin Levels and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children. *Endocr J.* 2005;52:519–524.
59. Dogru T, Ercin CN, Tapan S, Kantarcioglu M, Kara M, Bagci S. Adipocytokine levels in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;50:326–327.
60. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrel LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313–1321.
61. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathological features of NASH. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2005;10:1475–1484.
62. Finucane FM, Luan J, Wareham NJ, Sharp SJ, O’Rahilly S, Balkau B, Flyvbjerg A, Walker M, Højlund K, Nolan JJ, European Group for the Study of Insulin Resistance: Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Disease Risk Study Group), Savage BD. Correlation of the

leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 2009;52:2345–2349.

63. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, Rafiq N, Goodman Z, Chandhoke V, y Baranova A. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg*. 2008;18:1430–1437.

64. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002;36:403–409.

65. Singh DK, Sakhuja P, Rastogi A, Singh A, Gondal R, Sarin SK. Serum leptin levels correlate with body mass index but not with histologic disease severity in Indian patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Indian J Med Res*. 2013;137:986–987.

66. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52:1836–1846.

67. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism*. 2011;60:313–326.

68. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med*. 2010;152:93–100.

69. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim S-Y, Hamnvik OPR, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2011;301:E567–E584.

70. Pan H, Guo J, Su Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol Behav*. 2014;130:157–169.

71. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1247–1259.

72. DePaoli AM: 20 YEARS OF LEPTIN. Leptin in common obesity and associated disorders of metabolism. *J Endocrinol*. 2014;223:T71–T81.

73. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2005;42:1339–1348.

74. Morton GJ, Schwartz MW. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev*. 2011;91:389–411.

75. Minokoshi Y, Toda C, Okamoto S. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16:562.

76. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin M-F. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine*. 2010;37:11–32.

77. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012;55:2319–2326.

78. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100:2473–2476.
79. Yamaguchi N, Argueta JGM, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett*. 2005;579:6821–6826.
80. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50:2094–2099.
81. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005;166:1655–1669.
82. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85–97.
83. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science*. 2010;329:454–457.
84. Hu W, Li L, Yang M, Luo X, Ran W, Liu D, Xiong Z, Liu H, Yang G. Circulating Sfrp5 is a signature of obesity-related metabolic disorders and is regulated by glucose and liraglutide in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:290–298.
85. Hu Z, Deng H, Qu H. Plasma SFRP5 levels are decreased in Chinese subjects with obesity and type 2 diabetes and negatively correlated with parameters of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;99:391–395.
86. Tan X, Wang X, Chu H, Liu H, Yi X, Xiao Y. SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81:363–369.
87. Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis*. 2008;29:991–998.
88. Ehrlund A, Mejhert N, Lorente-Cebrián S, Aström G, Dahlman I, Laurencikiene J, Rydén M. Characterization of the Wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E503–508.
89. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J: Beyond Wnt inhibition. new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*. 2008;121:737–746.
90. Chang JT, Esumi N, Moore K, Li Y, Zhang S, Chew C, Goodman B, Rattner A, Moody S, Stetten G, Campochiaro PA, Zack DJ. Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet*. 1999;8:575–583.
91. Nathan E, Tzahor E. sFRPs: a declaration of (Wnt) independence. *Nat Cell Biol*. 2009;11:13.

92. Kawakami K, Yamamura S, Hirata H, Ueno K, Saini S, Majid S, Tanaka Y, Kawamoto K, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R. Secreted frizzled-related protein-5 is epigenetically downregulated and functions as a tumor suppressor in kidney cancer. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2011;128:541–550.
93. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2008;43:378–389.
94. Thompson MD, Monga SPS. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatol Baltim Md*. 2007;45:1298–1305.
95. Clevers . Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127:469–480.
96. Oh DY, Olefsky JM. Medicine. Wnt fans the flames in obesity. *Science*. 2010 23;329:397–398.
97. Tian F, Zhang Y, Wang L. [Non-canonical Wnt signaling contributes to development of non-alcoholic steatohepatitis in a rat model of type 2 diabetes mellitus]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi Zhonghua Ganzangbing Zazhi Chin J Hepatol*. 2013;21:537–542.
98. James WPT. WHO recognition of the global obesity epidemic. *Int J Obes*. 2008;32:S120–S126.
99. Parikh RM, Mohan V. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16:7–12.
100. DeMaria EJ. Bariatric Surgery for Morbid Obesity. *N Engl J Med*. 2007;356:2176–2183.
101. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41:1149–1160.
102. Argentou M, Tiniakos DG, Karanikolas M, Melachrinou M, Makri MG, Kittas C, Kalfarentzos F. Adipokine Serum Levels Are Related to Liver Histology in Severely Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2009;19:1313–1323.
103. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Wachter NH, Tusie-Luna MT, Cruz M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes*. 2008;57:509–513.
104. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–419.
105. Association AD, otros. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008;31:S55–S60.
106. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH, otros. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497–509.
107. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc*. 2008;3:1903–1908.

108. Wei C, Li J, Bumgarner RE. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics*. 2004;5:87.
109. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat Oxf Engl*. 2003;4:249–264.
110. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma Oxf Engl*. 2003;19:185–193.
111. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
112. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:103.
113. Blüher M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab*. 2014;3:230–240.
114. Kishida K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin as a routine clinical biomarker. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28:119–130.
115. Lemoine M, Ratziu V, Kim M, Maachi M, Wendum D, Paye F, Bastard JP, Poupon R, Housset C, Capeau J, Serfaty L. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2009;29:1431–1438.
116. Bonneau GA, Pedrozo WR, Berg G. Adiponectin and waist circumference as predictors of insulin-resistance in women. *Diabetes Metab Syndr*. 2014;8:3–7.
117. Tsubakio-Yamamoto K, Sugimoto T, Nishida M, Okano R, Monden Y, Kitazume-Taneike R, Yamashita T, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Inagaki M, Nakatani K, Masuda D, Ohama T, Matsuyama A, Nakagawa-Toyama Y, Ishigami M, Komuro I, Yamashita S. Serum adiponectin level is correlated with the size of HDL and LDL particles determined by high performance liquid chromatography. *Metabolism*. 2012;61:1763–1770.
118. Vergès B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, Gambert P. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1364–1369.
119. Oku H, Matsuura F, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Maeda N, Ohama T, Ishigami M, Nishida M, Hirano K, Kihara S, Hori M, Shimomura I, Yamashita S. Adiponectin deficiency suppresses ABCA1 expression and ApoA-I synthesis in the liver. *FEBS Lett*. 2007;581:5029–5033.
120. Matsuura F, Oku H, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Maeda N, Tsujii K, Ishigami M, Nishida M, Hirano K, Kihara S, Hori M, Shimomura I, Yamashita S. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358:1091–1095.
121. Qiao L, Zou C, van der Westhuyzen DR, Shao J. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes* 2008;57:1824–1833.

122. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Michieli F., Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2005;42:1175–1183.
123. Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, Mancini E, Marchetti G, Bonotti A, Baldi S, Solito B, Giannetti M, Pinchera A, Santini F, Ferrannini E. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*. 2009;19:467–474.
124. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R, Gentilcore E, Natale S, Cassader M, Rizzetto M, Pasquali R, Marchesini G. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3498–3504.
125. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:412–421.
126. Handa P, Maliken BD, Nelson JE, Morgan-Stevenson V, Messner DJ, Dhillon BK, Klintworth HM, Beauchamp M, Yeh MM, Elfers CT, Roth CL, Kowdley KV. Reduced adiponectin signaling due to weight gain results in nonalcoholic steatohepatitis through impaired mitochondrial biogenesis. *Hepatology*, 2014;60:133–145.
127. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005;54:117–121.
128. Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, Nakamura S, Nabemoto S, Takeshita Y, Misu H, Kurita S, Sakurai M, Yokoyama M, Zen Y, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism*. 2007;56:1478–1485.
129. Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:237–242.
130. Uribe M, Zamora-Valdés D, Moreno-Portillo M, Bermejo-Martínez L, Pichardo-Bahena R, Baptista-González HA, Ponciano-Rodríguez G, Uribe MH, Medina-Santillán R, Méndez-Sánchez N. Hepatic expression of ghrelin and adiponectin and their receptors in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2008;7:67–71.
131. Carazo A, León J, Casado J, Gila A, Delgado S, Martín A, Sanjuan L, Caballero T, Muñoz JA, Quiles R, Ruiz-Extremera A, Alcázar LM, Salmerón J. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1. *Obes Surg*. 2011;21:492–500.
132. Liu M, Liu F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28:25–31.
133. Wang ZV, Schraw TD, Kim J-Y, Khan T, Rajala MW, Follenzi A, Scherer PE. Secretion of the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin Critically Depends on Thiol-Mediated Protein Retention. *Mol Cell Biol*. 2007;27:3716–3731.
134. Gu HF. Biomarkers of Adiponectin: Plasma Protein Variation and Genomic DNA Polymorphisms. *Biomark Insights*. 2009;4:123–133.

135. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356–1362.
136. Hindle AK, Edwards C, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Reactivation of adiponectin expression in obese patients after bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2010;24:1367–1373.
137. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci, S, Bagci MS, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3584–3589.
138. Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol*. 2008;74:1610–1619.
139. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, Méndez-Giménez L, Rotellar F, Valentí V, Moncada R, Martí P, Sola I, Silva C, Salvador J, Frühbeck G. Activation of noncanonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:E1407–1417.
140. Schulte DM, Müller N, Neumann K, Oberhäuser F, Faust M, Güdelhöfer H, Brandt B, Krone W, Laudes M. Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS One*. 2012;7:e32437.
141. Esteve P, Sandonis A, Cardozo M, Malapeira J, Ibañez C, Crespo I, Marcos S, Gonzalez-Garcia S, Toribio ML, Arribas J, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P. SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2011;14:562–569.
142. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33:656–668.
143. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta BBA*. 2013;1830:3267–3288.
144. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta BBA*. 2013;1830:3289–3303.
145. Bataille A, Manautou J. Nrf2: A Potential Target for New Therapeutics in Liver Disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92:340–348.
146. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30:42–59.
147. Chambel SS, Santos-Gonçalves A, Duarte TL. The Dual Role of Nrf2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Regulation of Antioxidant Defenses and Hepatic Lipid Metabolism. *BioMed Res Int*. 2015;2015, 2015:e597134.
148. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:3369–3374.
149. He J, Hu B, Shi X, Weidert ER, Lu P, Xu M, Huang M, Kelley EE, Xie W. Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitizes mice to nonalcoholic steatohepatitis by deactivating mitochondrial sirtuin deacetylase Sirt3. *Mol Cell Biol*. 2013;33:2047–2055.

150. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res.* 2009;48:1–26.
151. Estep JM, Baranova A, Hossain N, Elariny H, Ankrah K, Afendy A, Chandhoke V, Younossi ZM. Expression of cytokine signaling genes in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis. *Obes Surg.* 2009;19:617–624.
152. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J.* 2013;450:253–264.
153. Wang G-P. Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2010;1:85.
154. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE.* 2011;6:e23937.
155. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, Sugimoto K, Ohashi K, Teradaira R, Inoue T, Hamajima N, Hashimoto S. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2013;424:99–103.
156. Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, Leoni S, Bottazzo GF, Masotti A, Nobili V. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2011;91:283–293.
157. Gori M, Arciello M, Balsano C. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Biomarkers and Prognostic Tools during the Transition from Steatosis to Hepatocarcinoma. *BioMed Res Int.* 2014;2014:e741465.
158. Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol.* 2013;2013.
159. Leclerc S, Heydel J-M, Amossé V, Gradinaru D, Cattarelli M, Artur Y, Goudonnet H, Magdalou J, Netter P, Pelczar H, Minn A. Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;107:201–213.
160. Bisceglia L, Fischetti L, De Bonis P. Novel human pathological mutations. Gene symbol: SLC3A1. Disease: cystinuria. *Hum Genet.* 2010;127:489.
161. Nakamura E, Iwakawa M, Furuta R, Ohno T, Satoh T, Nakawatari M, Ishikawa K, Imadome K, Michikawa Y, Tamaki T, Kato S, Kitagawa T, Imai T. Villin1, a novel diagnostic marker for cervical adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:1146–1153.

10. ARTÍCULO PUBLICADO

.

SFRP5 hepatic expression is associated with non-alcoholic liver disease in morbidly obese women

Roxana Gutiérrez-Vidal,¹ Joel Vega-Badillo,¹ Laura M. Reyes-Fermín,¹ Hugo A. Hernández-Pérez,¹ Fausto Sánchez-Muñoz,² Guadalupe S. López-Álvarez,³ Elena Larrieta-Carrasco,⁴ Itzel Fernández-Silva,⁵ Nahum Méndez-Sánchez,⁶ Armando R. Tovar,⁷ Hugo Villamil-Ramírez,¹ Ana M. Mejía-Domínguez,⁸ Teresa Villarreal-Molina,⁹ Rogelio Hernández-Pando,¹⁰ Francisco Campos-Pérez,⁵ Carlos A. Aguilar-Salinas,¹¹ Samuel Canizales-Quinteros^{1,*}

¹ Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Mexico City, Mexico.

² Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh), Mexico City, Mexico.

³ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Zacatenco (CINVESTAV), Mexico City, Mexico.

⁴ Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico.

⁵ Clínica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Hospital General Dr. Rubén Leñero, Mexico City, Mexico.

⁶ Unidad de Hígado, Fundación Clínica Médica Sur, Mexico City, Mexico.

⁷ Departamento Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ, Mexico City, Mexico.

⁸ Banco de Sangre, INCICh, Mexico City, Mexico.

⁹ Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, INMEGEN, Mexico City, Mexico.

¹⁰ Departamento de Patología, INCMNSZ, Mexico City, Mexico.

¹¹ Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, Mexico City, Mexico.

ABSTRACT

Background and aims. Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) was recently described as a new adipokine protective for hepatic steatosis and other obesity-related complications in the mouse model. To date, SFRP5 expression in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has not been fully assessed in humans. We measured circulating SFRP5 levels and its expression in liver and adipose tissue, and evaluated its association with NAFLD in morbidly obese women. **Material and methods.** Fifty-four morbidly obese women undergoing bariatric surgery were included in the study. Liver biopsies were used for histology and hepatic triglyceride content quantification. Circulating SFRP5 levels were measured through enzyme-linked immunosorbent assay, and SFRP5 expression was performed in hepatic and adipose tissue (subcutaneous and visceral). **Results.** Although circulating SFRP5 levels showed a tendency to decrease with NAFLD progression, no significant differences were observed among non-alcoholic steatosis, steatohepatitis, and control subjects. Hepatic SFRP5 expression showed a negative correlation with hepatic triglyceride content ($r = -0.349$, $P = 0.016$ for mRNA and $r = -0.291$, $P = 0.040$ for SFRP5 protein) and ALT serum levels ($r = -0.437$, $P = 0.001$ for SFRP5 protein). In addition, hepatic SFRP5 protein levels were significantly lower in NASH than in control subjects ($P = 0.006$). **Conclusion.** This is the first study reporting an association of hepatic SFRP5 expression with NAFLD in humans.

Key words. SFRP5. Hepatic expression. NASH. Morbid obesity. Hepatic triglyceride content.

Correspondence and reprint request: Samuel Canizales-Quinteros, Ph.D. Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química / Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico. Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Tlalpan 14610. Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5350-1900, Ext.: 1186. Fax +52 55 5350-1999 E-mail: cani@unam.mx

Manuscript received: December 03, 2014.

Manuscript accepted: February 22, 2015.

BACKGROUND

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become one of the most common liver diseases in western countries, showing the highest prevalence in Hispanic populations.¹⁻⁴ NAFLD ranges from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by fatty liver with inflammation and hepatocellular injury.^{5,6} Obesity is one

of the major risk factors for NAFLD, present in up to 95% of morbidly obese patients.^{7,8} Adipose tissue dysfunction results in altered profiles of adipokine secretion contributing to NAFLD development.^{9,10} To date, adiponectin is the only adipokine recognized to have a protective effect on NAFLD, as demonstrated by several studies associating high levels of adiponectin with a reduced risk of NAFLD in humans.¹¹⁻¹⁴ Recent studies in mice suggest that Sfrp5 (secreted frizzled-related protein 5) is also a protective adipokine for glucose intolerance, hepatic steatosis and fibrosis.^{15,16} However, the role of Sfrp5 in humans is not clear. Although serum SFRP5 levels have been found to be higher in lean and non-type 2 diabetes subjects than in obese and type 2 diabetes patients;^{17,18} other studies have reported opposite results.^{19,20} Moreover, Catalán, *et al.*²¹ recently found no differences in SFRP5 serum concentrations in NAFLD patients and controls.

Although in mouse model Sfrp5 is expressed at substantially higher in white adipose tissue (WAT) than in others tissues,¹⁵ in humans this protein is not actively secreted by WAT and its expression is higher in liver than in adipose tissue; however, its role in human NAFLD is not fully understood.^{21,22}

The aim of the present study was to characterize serum, hepatic and adipose tissue expression of SFRP5 mRNA and protein, and to explore its association with NAFLD in morbidly obese women.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The present cross-sectional study included 54 morbidly obese Mexican women aged 21-60 years. All participants underwent bariatric surgery at the Hospital General Dr. Rubén Leñero in Mexico City. During surgery, wedge biopsies from the free border of the left liver lobe and adipose tissue biopsies (visceral and subcutaneous) were obtained from all patients. Subjects with positive serology tests for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis C antibody (anti-HCV) (Ortho Clinical Diagnostic Johnson-Johnson, UK), or with alcohol consumption > 20 g/day were not included in the study. All participants provided informed consent. The study protocol conformed to the 1975 Declaration of Helsinki ethical guidelines, and the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) approved the research.

Anthropometric and biochemical parameters

Body mass index (BMI) was defined as weight in kilograms divided by the square of height in meters (kg/m^2). Blood samples were taken after a 10-h overnight fast for biochemical measurements. Blood glucose, insulin, triglycerides, total and HDL cholesterol (HDL-C) were measured as previously described,²³ and insulin sensitivity was calculated using the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) index.²⁴ Serum concentrations of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma glutamyl transpeptidase (GGT) were measured with commercially available standardized methods (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Serum adiponectin and leptin levels were determined using commercially available enzymatic kits (EMD Millipore, St. Charles, MO, USA). Serum SFRP5 levels were measured in duplicate in 47 out of 54 subjects, using commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits (MyBioSource, San Diego, California, USA). Serum samples were not available from 7 subjects. Type 2 diabetes (T2D) was defined as either self-reported use of hypoglycemic agents or fasting plasma glucose levels ≥ 126 mg/dL.²⁵ Under these criteria, 23 patients had T2D (13 receiving hypoglycemic treatment: 8 with metformin monotherapy and 5 with metformin/glibenclamide combination).

Liver histology

Liver biopsy specimens were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome, and evaluated by an experienced pathologist. Histological characteristics were determined according to the Kleiner scoring system.²⁶ Steatosis was scored in a scale 0-3, grade of inflammation 0-3, and hepatocellular ballooning 0-2. These histopathological features were used to estimate NAFLD activity score (NAS). All participants were classified as controls (subjects without steatosis), individuals with hepatic steatosis (NAS ranging from 1 to 2), individuals with non-defining NASH (NAS ranging from 3 to 4), and individuals with NAS ≥ 5 were considered as NASH. Fibrosis was staged in grade 0-4.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted from visceral and subcutaneous adipose tissue using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Germantown, Maryland,

USA), and from hepatic tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). 500 ng of total RNA were used for cDNA synthesis using TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression of SFRP5 and the housekeeping genes (*ACTB* β -actin and *GAPDH* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were determined by quantitative PCR using the LightCycler TaqMan Master Real time PCR kit in a Light Cycler 480 II thermal cycler (Roche, Rotkreuz, Switzerland). TaqMan Gene expression assay Hs00169366_m1 (Applied Biosystems) was used to quantify SFRP5 mRNA levels. For housekeeping genes, pre-validated assays using LNA Taqman probes from the Universal ProbeLibrary (Roche) and specific primers were used. *ACTB* (NM_001101) mRNA expression was measured as reference using primers CCAACCGCGAGAAGATGA (forward) and CCAGAGGCGTACAGGGATAG (reverse), and probe #64 (Cat. No. 04688635001); *GAPDH* (NM_002046) mRNA expression was measured as reference using primers AGCCACATCGCTCAGACAC (forward) and GCCCAATACGACCAAATCC (reverse), and probe #60. Relative mRNA levels were calculated with LightCycler Relative Quantification Analysis software.

Protein expression analysis

Liver and adipose tissue biopsies (70 mg) were homogenized in cold RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (Roche). Total protein concentration was quantified using the DC protein Assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Protein extracts (50 μ g) were separated by SDS-PAGE on 10% gels and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Membranes were incubated overnight with goat anti-SFRP5, or mouse anti- α -tubulin primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). α -tubulin was used as constitutive protein. Immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Millipore, Billerica, MA, USA), and blots were quantified using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). All samples were analyzed in duplicate and results are presented as SFRP5/ α -tubulin ratio.

Hepatic triglyceride content

Liver tissue (50 mg) was homogenized in saline solution (0.9%) and total lipids were extracted with

the Folch method.²⁷ Briefly, total lipids were extracted in chloroform/methanol (2:1 vol/vol). The organic phase was dried under nitrogen stream, lipids were re-suspended in isopropanol and 10% Triton X-100. Triglyceride concentrations were determined by spectrophotometry (Beckman DU 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA), using commercial colorimetric assay kits (Diagnostic systems, Holzheim Germany) and normalized to total protein concentration.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed liver samples from a non-NASH individual were processed; 3- μ m thick paraffin sections were used for SFRP5 immunohistochemistry. Briefly, deparaffinized liver sections were treated by antigen retrieval with 20X ImmunoDNA Retriever Citrate, and then blocked with ImmunoDetector Peroxidase Blocker (Bios SB, Santa Barbara CA, USA). Protein was identified by two different anti-SFRP5 antibodies (mouse monoclonal and goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology). Liver samples were then treated with the corresponding probe (mouse or goat) followed by Mouse- or Goat-On-Rodent HRP-Polymer (Biocare Medical, Concord, CA, USA) and DAB chromogen. Samples were counterstained with hematoxylin.

Nuclear and cytoplasm SFRP5 quantification

Nuclear and cytoplasm proteins were isolated from hepatic tissue (100 mg) using a protein isolation kit (ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction kit, Fermentas, Canada). Protein concentrations were determined using the DC protein Assay. SFRP5 immunoblots were performed in nuclear and cytoplasm proteins (20 μ g) in SDS-PAGE on 10% gels as previously described.

Statistical analysis

SFRP5 mRNA and protein levels, serum insulin, triglyceride, AST, ALT, and GGT levels, HOMA-IR and hepatic triglyceride content were log-transformed to achieve normal distribution. Statistical differences among study groups were calculated using ANOVA or Kruskal-Wallis test for numeric variables, depending on variables' distribution. Chi square test was used for nominal categorical variables. Correlations were obtained by Spearman's test. Moreover, multivariate linear regression models were fit to construct a predictive model for NAFLD

activity score. The main effects of age, BMI, triglycerides, total cholesterol, HDL-C, adiponectin, leptin, insulin levels, HOMA-IR, AST, ALT and hepatic SFRP5 protein content were included, and a step-wise backward elimination procedure was used to exclude predictors from the model. P values < 0.05 were considered significant. Analyses were conducted with the SPSS v.14 program (SPSS, Chicago, USA).

RESULTS

The study included fifty-four consecutive morbidly obese female patients, 9 subjects without steatosis (17.7%), 13 subjects with steatosis (24.1%), 10 subjects with non-defining NASH (17.5%), and 22 subjects with NASH (40.7%). Comparison of clinical and biochemical characteristics among groups are shown in table 1. Of note, triglyceride serum levels were significantly lower in controls as compared to all NAFLD groups, and HDL-C serum levels were higher in controls, although the difference was statistically significant only when compared to the NASH group. Moreover, the NASH group showed lower serum adiponectin levels as compared to the control group (P = 0.04, adjusted for T2D and hypoglycemic treatment). As expected, hepatic triglyceride content (HTGC) clearly increased according to the level of liver damage. Accordingly, the frequency of individuals with T2D subjects also increased with NAFLD progression; however, only the difference between the control and NASH groups was statistically significant.

Circulating SFRP5 levels in NAFLD

Serum SFRP5 levels decreased with NAFLD progression, although the differences were not significant among groups (P > 0.05) (Figure 1). In addition, SFRP5 levels were not significantly different between individuals with stage 0 (n = 39) and stage 1 (n = 6) fibrosis (44.8 ± 2.1 vs. 40.6 ± 2.6 ng/mL, P = 0.4), but were lower in both patients with stage 2 fibrosis (35.8 ± 5.9 ng/mL).

Because hypoglycemic agents may alter SFRP5 circulating levels,¹⁷ a separate analysis was performed excluding all diabetic individuals receiving pharmacological treatment (n = 13), still observing no significant differences among groups. In contrast, serum SFRP5 levels showed a significant positive correlation with serum adiponectin (r = 0.330; P = 0.02), but a negative correlation with serum leptin (r = -0.381; P = 0.01) and leptin/adiponectin

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters of the study participants.

Characteristics	Control (n = 9)	Steatosis (n = 13)	non-defining NASH (n = 10)	NASH (n = 22)	P value
Age (yrs)	34.2 ± 7.9	36.7 ± 8.8	39.1 ± 11.1	35.1 ± 9.6	n.s.
BMI (kg/m ²)	44.6 ± 6.0	41.8 ± 3.7	45.2 ± 5.1	45.6 ± 6.8	n.s.
Glucose (mg/dL)	98.9 ± 13.2	100.7 ± 15.9	108.9 ± 19.2	120.7 ± 21.3	< 0.05 [§]
Insulin (mIU/L)	9.1 (4.8-14.9)	12.6 (4.3-28.6)	8.9 (6.1-19.9)	10.3 (8.4-40.0)	n.s.
HOMA-IR	2.2 (1.0-3.4)	4.0 (1.5-6.9)	2.3 (1.8-5.9)	3.1 (2.2-11.7)	n.s.
Triglycerides (mg/dL)	89.9 (69.8-102.5)	164.0 (97.5 - 211.5)	147.5 (116.0-166.75)	138.0 (114.0-190.8)	< 0.05 ^{†,§}
Cholesterol (mg/dL)	164.6 ± 29.7	186.9 ± 46.5	163.8 ± 22.4	159.6 ± 30.8	n.s.
HDL-C (mg/dL)	40.5 ± 9.3	34.5 ± 11.1	31.3 ± 9.4	31.5 ± 9.6	0.02 [§]
AST (IU/mL)	22.0 (18.5-43.0)	30.0 (22.0 - 72.5)	39.0 (25.5-64.5)	42.0 (22.0-71.5)	n.s.
ALT (IU/mL)	21.0 (13.0-58.5)	22.0 (19.5 - 44.0)	22.0 (19.0 - 47.5)	31.0 (26.0-45.0)	n.s.
GGT (IU/mL)	14.0 (9.5 - 34.5)	13.0 (11.5 - 34.0)	15.5 (12.8 - 26.0)	19.0 (14.0-29.0)	n.s.
Adiponectin (mg/L)	9.2 ± 3.0	8.3 ± 3.7	6.6 ± 1.9	6.9 ± 1.7	0.04 [§]
Leptin (ng/mL)	38.5 ± 18.7	46.1 ± 32.0	52.3 ± 36.7	51.7 ± 32.1	n.s.
LAR	2.5 ± 1.3	5.2 ± 5.4	3.6 ± 0.77	7.5 ± 8.4	n.s.
HTGC (mg Tg/mg protein)	0.54 ± 0.29	1.23 ± 0.89	1.42 ± 0.94	3.42 ± 2.29	< 0.05 ^{†,§}
T2D (%)	1(11.1)	3 (23.1)	4 (40.0)	15 (68.2)	0.005 [§]
Hypoglycemic agents (%)	0	0	3 (30.0)	10 (45.4)	0.04 [§]

Data are expressed as mean ± standard deviation or median (interquartile range). BMI: body mass index. HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol. AST: aspartate transaminase. ALT: alanine transaminase. GGT: gamma glutamyl transpeptidase. LAR: leptin/adiponectin ratio. HTGC: hepatic triglyceride content. T2D: type 2 diabetes. Hypoglycemic agents: metformin and glibenclamide. * P value corresponds to comparisons between control and steatosis groups. † P value corresponds to comparisons between control and non-defining NASH groups; and § P value corresponds to comparisons between control and NASH groups; n.s.: non significant.

ratio (LAR) ($r = -0.455$; $P = 0.001$) (Table 2), which remained significant after adjusting for T2D.

SFRP5 expression and association with NAFLD

SFRP5 mRNA was detectable in 34% of subcutaneous and in 63% of visceral adipose tissue samples.

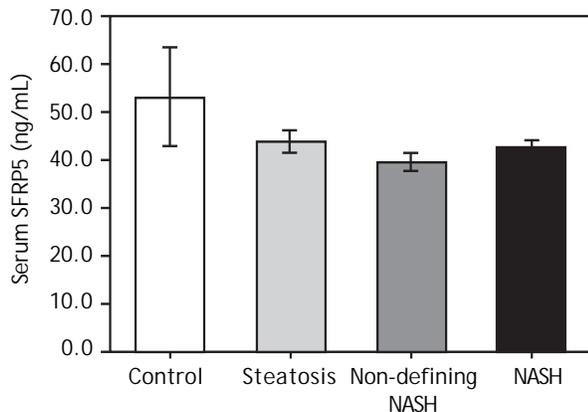


Figure 1. Circulating SFRP5 in obesity-associated comorbidities. Serum SFRP5 levels in control ($n = 7$), steatosis ($n = 11$), non-defining NASH ($n = 10$) and NASH ($n = 19$) subjects. Serum SFRP5 levels were measured in 47 individuals. Data are expressed as mean \pm SEM.

Table 2. Correlation between serum SFRP5 levels with biochemical parameters.

Characteristics	Serum SFRP5 (ng/mL)
Hepatic mRNA SRRP5	-0.21
Hepatic SFRP5 protein	-0.08
Age (yrs)	-0.19
BMI (kg/m ²)	-0.05
Glucose (mg/dL)	-0.18
Insulin (mIU/L) [‡]	-0.10
HOMA_IR [‡]	-0.16
Triglycerides (mg/dL)	0.04
Cholesterol (mg/dL)	0.04
HDL-C (mg/dL)	0.20
LDL-C (mg/dL)	-0.10
AST (IU/mL)	-0.15
ALT (IU/mL)	0.23
GGT (IU/mL)	0.06
Serum adiponectin (mg/L)	0.33*
Serum leptin (ng/mL)	-0.38**
LAR	-0.45**
HTGC (mg TG/mg protein)	-0.06

BMI: body mass index. HOMA-IR: Homeostatic model assessment for insulin resistance. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol. AST: aspartate transaminase. ALT: alanine transaminase. GGT: gamma glutamyl transpeptidase. LAR: leptin-adiponectin ratio. HTGC: hepatic triglyceride content. [‡]Analysis was performed in non-type 2 diabetes subjects. *P value < 0.05. **P value < 0.01.

In contrast, hepatic SFRP5 mRNA was detectable in all samples, and significantly higher than in adipose tissue samples ($P < 0.01$). The presence of SFRP5 in hepatocytes was confirmed by immunohistochemistry, as immunoreactivity was observed in both the cytoplasm and the nucleus of hepatocytes (Figure 2A). These results were further confirmed with SFRP5 immunodetection in nuclear and cytoplasm protein extracts (Figure 2B).

Interestingly, both SFRP5 hepatic mRNA and protein levels showed a significant negative correlation with HTGC ($r = -0.349$, $P = 0.016$ and $r = -0.291$, $P = 0.040$, respectively) (Figures 3A-3B). In addition, SFRP5 hepatic protein levels showed a significantly negative correlation with serum ALT ($r = -0.437$, $P = 0.001$) and GGT levels ($r = -0.287$, $P = 0.037$) (Table 3).

In order to determine whether SFRP5 is associated with NAFLD, hepatic SFRP5 expression was compared among groups. Hepatic SFRP5 mRNA levels were 27.1 % lower in individuals with steatosis ($P = 0.08$, adjusted for T2D status and hypoglycemic agent) and 36.9% lower in individuals with NASH ($P = 0.026$, adjusted for T2D status and

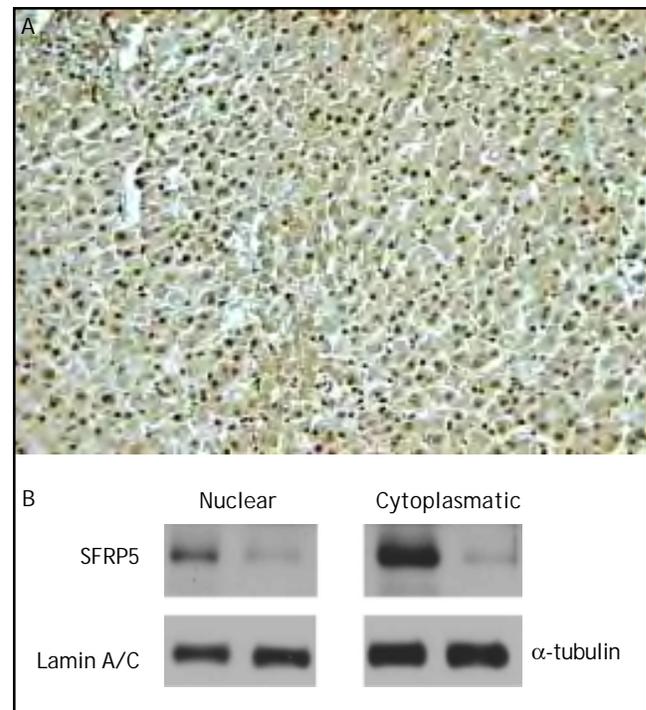


Figure 2. Cellular localization of SFRP5 in hepatic tissue. A. A representative example of SFRP5 immunoblotting in hepatic tissue of a non-NASH subject, immunoreactivity is present in both nuclei and cytoplasm (200x magnification). B. SFRP5 immunoblotting in nuclear and cytoplasmic fractions from hepatic tissue (two representative examples).

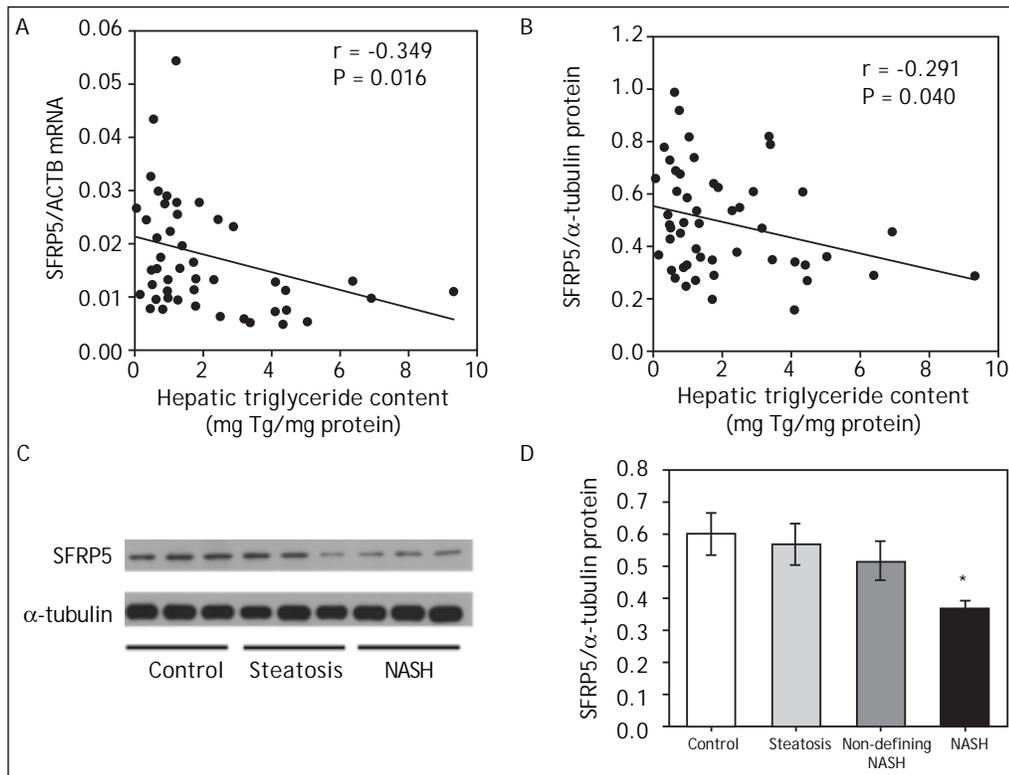


Figure 3. Relationship between hepatic SFRP5 expression and NAFLD. A. SFRP5 mRNA levels and hepatic triglyceride content. B. Hepatic SFRP5 protein levels and hepatic triglyceride content. C. Representative examples of SFRP5 immunoblotting in hepatic tissue of control, steatosis and NASH individuals. D. Comparison of SFRP5 protein expression in control, steatosis, non-defining-NASH, and NASH subjects. Data are expressed as mean \pm SEM. * Indicates statistically significant differences between groups ($P < 0.001$).

Table 3. Correlation between hepatic SFRP5 protein levels with biochemical parameters.

Characteristics	SFRP5 protein	
	Correlation coefficient	P value
Age (yrs)	0.049	0.724
BMI (kg/m ²)	-0.081	0.563
Insulin (mIU/L)*	0.014	0.946
HOMA-IR*	0.010	0.961
Triglycerides (mg/dL)	0.069	0.619
Cholesterol (mg/dL)	0.081	0.550
HDL-C (mg/dL)	-0.114	0.411
AST (IU/mL)	-0.205	0.141
ALT (IU/mL)	-0.437	0.001
GGT (IU/mL)	-0.287	0.037
Adiponectin (mg/L)	0.028	0.845
Leptin (mg/mL)	0.025	0.863
LAR	0.009	0.949
HTGC (mg TG/mg protein)	-0.291	0.040

BMI: body mass index. HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol. AST: aspartate transaminase. ALT: alanine transaminase. GGT: gamma glutamyl transpeptidase. LAR: leptin-adiponectin ratio. HTGC: hepatic triglyceride content. * Analysis was performed in non-type 2 diabetes subjects only.

hypoglycemic treatment) as compared to controls. In addition, SFRP5 protein levels were 38.8 % lower in the NASH group ($P = 0.006$, adjusted for T2D status and hypoglycemic treatment) as compared to controls (Figures 3C and 3D). Hepatic SFRP5 protein levels were not significantly different between individuals with stage 0 ($n = 45$) and stage 1 ($n = 7$) fibrosis (0.48 ± 0.03 vs. 0.48 ± 0.04 , $P = 0.7$), but were lower in both patients with stage 2 fibrosis (0.34 ± 0.019).

Table 4 describes a multivariate linear regression model to predict NAFLD activity score. According to this model, T2D diagnosis, HOMA-IR, serum ALT, leptin and adiponectin levels, and hepatic SFRP5 protein content were predictive factors independently associated with NAFLD activity score.

DISCUSSION

In the present study, serum SFRP5 levels decreased with NAFLD progression although differences did not reach statistical significance, in consistency with the findings of Catalán, *et al.*²¹ Interestingly, and in agreement with previous studies, SFRP5 levels showed a significantly positive correlation with adiponectin,^{17,18,28} and an inverse correlation with leptin and LAR,²⁹ which has been

Table 4. Multivariate regression model to predict NAFLD activity score.

Characteristics	B	SE	P value
T2D diagnosis	1.861	0.487	< 0.001
HOMA-IR	0.085	0.039	0.034
ALT (IU/mL)	2.061	0.819	0.016
Leptin (ng/mL)	2.169	0.838	0.013
Adiponectin (mg/L)	-0.185	0.084	0.033
Hepatic SFRP5 protein	-3.334	1.254	0.011
Constant	3.635	2.310	0.124

NAFLD activity score is the unweighted sum of steatosis (0-3), lobular inflammation (0-3), and hepatocellular ballooning (0-2) scores; B: unstandardized coefficient. SE: standard error of unstandardized coefficient. Constant: constant of the regression model. T2D: type 2 diabetes. HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance. ALT: alanine transaminase.

considered a useful measure of insulin sensitivity.

In this study, we found low SFRP5 mRNA levels in visceral and subcutaneous adipose tissue from morbidly obese women. These results are in agreement with a previous study reporting extremely low levels of SFRP5 transcript in human WAT, and SFRP5 not being actively secreted from adipocytes.²² Because there is scarce information on SFRP5 expression in other metabolically relevant non-adipose tissues in humans, we quantified its mRNA and protein levels in liver biopsies from morbidly obese women, confirming the presence of SFRP5 by immunohistochemistry and immunoblot analyses. We then tested whether hepatic SFRP5 levels were associated with NAFLD. SFRP5 mRNA and protein levels correlated negatively with HTGC and also were inversely associated with non-alcoholic steatohepatitis. These results are in agreement with the report of Ouchi, *et al.*,¹⁵ who observed higher HTGC and liver steatosis in *Sfrp5* deficient mice fed a high-fat diet. Furthermore, a recent study reported that *Sfrp5* may ameliorate liver fibrosis in the mouse model.¹⁶ Unfortunately, because only 2 individuals had stage 2 fibrosis, it was not possible to assess whether SFRP5 has a role in human liver fibrosis. Finally, although circulating SFRP5 levels did not differ significantly according to NAFLD severity, SFRP5 mRNA and protein levels were decreased in hepatic tissue of NASH subjects as compared to controls. This may be consistent with an autocrine role of SFRP5 in the liver, as previously observed for SFRP5 in pancreatic beta-cell proliferation, participating in WNT signaling pathway.³⁰ Further studies are required to understand the mechanisms by which hepatic SFRP5 is associated with NAFLD.

Hepatic SFRP5 protein levels were found to be an independent predictor of NAFLD by multivariate analysis. This analysis also confirmed other NAFLD predictors such as T2D, adiponectin and ALT serum

levels.^{11,13,31} Although serum adiponectin levels and hepatic SFRP5 protein levels were both identified as NAFLD predictors, it is noteworthy that these parameters were not significantly correlated in the present study. These findings suggest hepatic SFRP5 may have an important role in obesity-related metabolic complications.

Because this study included only morbidly obese women, our results may not be applicable to men and/or to other classes of obesity. Moreover, because this is a cross-sectional study, it is not possible to identify causality of low SFRP5 hepatic expression in human NAFLD. One more limitation is that serum wingless-type MMTV integration site family member 5A (WNT5A) levels, previously associated with NAFLD,²¹ were not measured. SFRP5 binds and antagonizes WNT5A, inhibiting its downstream non-canonical signaling pathway that affects various metabolic traits.^{19,21,30} Additional studies are required to replicate these findings, and to further characterize the role of hepatic SFRP5 and other SFRPs (SFRP1, 2 and 4) known to have a role in adipogenesis, which could also be involved in the development of NAFLD.^{15,22,32}

In conclusion, this is the first study reporting the association of reduced SFRP5 hepatic expression with hepatic triglyceride accumulation and with severity NAFLD in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luz E. Guillén-Pineda for his technical assistance. This study was supported by grants provided by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT SALUD-2012-01-182801), and by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IA202413). Roxana Gutiérrez-Vidal is in the PhD program in Ciencias Bioquímicas at UNAM

and was supported by a graduate scholarship from the CONACyT (no. 207486). Hugo A. Hernández Pérez was supported by postdoctoral fellowship DGA-PA-UNAM.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

ABBREVIATIONS

- **ACTB:** β -actin.
- **ALT:** alanine aminotransferase.
- **AST:** aspartate aminotransferase.
- **BMI:** body mass index.
- **GAPDH:** glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
- **GGT:** gamma glutamyl transpeptidase.
- **HDL-C:** high-density lipoprotein cholesterol.
- **HOMA-IR:** homeostatic model assessment for insulin resistance.
- **HTGC:** hepatic triglyceride content.
- **LAR:** leptin-adiponectin ratio.
- **NAFLD:** non-alcoholic fatty liver disease.
- **NAS:** NAFLD activity score.
- **NASH:** non-alcoholic steatohepatitis.
- **SFRP5:** secreted frizzled-related protein 5.
- **T2D:** type 2 diabetes.
- **WAT:** white adipose tissue.

REFERENCES

1. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; (17 Suppl.): S186-90.
2. Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 861-79.
3. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-95.
4. Weston SR, Leyden W, Murphy R, Bass NM, Bell BP, Manos MM, Terrault NA. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 372-9.
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc Mayo Clin* 1980; 55: 434-8.
6. Tiniakos DG. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients. *Gastroentérologie Clin Biol* 2009; 33: 930-9.
7. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 2005; 352: 1138-145.
8. Machado MV, Coutinho J, Carepa F, Costa A, Proença H, Cortez-Pinto H. How adiponectin, leptin, and ghrelin orchestrate together and correlate with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 1166-72.
9. Rasouli N, Molavi B, Elbein SC, Kern PA. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 1-10.
10. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009; 50: 957-69.
11. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54.
12. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R, Gentilcore E, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498-504.
13. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011; 60: 313-26.
14. Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-18.
15. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, et al. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 2010; 329: 454-7.
16. Chatani N, Kamada Y, Kizu T, Ogura S, Furuta K, Egawa M, Hamano M, et al. Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2014 (in press).
17. Hu W, Li L, Yang M, Luo X, Ran W, Liu D, Xiong Z, et al. Circulating Sfrp5 is a signature of obesity-related metabolic disorders and is regulated by glucose and liraglutide in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 290-8.
18. Hu Z, Deng H, Qu H. Plasma SFRP5 levels are decreased in Chinese subjects with obesity and type 2 diabetes and negatively correlated with parameters of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 99: 391-5.
19. Lu YC, Wang CP, Hsu CC, Chiu CA, Yu TH, Hung WC, Lu LF, et al. Circulating secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and wingless-type MMTV integration site family member 5a (Wnt5a) levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2013; 29: 551-6.
20. Carstensen M, Herder C, Kempf K, Erlund I, Martin S, Koenig W, Sundvall J, et al. Sfrp5 correlates with insulin resistance and oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 2013; 43: 350-7.
21. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, Méndez-Giménez L, et al. Activation of noncanonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E1407-17.
22. Ehrlund A, Mejhert N, Lorente-Cebrián S, Aström G, Dahlman I, Laurencikiene J, Rydén M, et al. Characterization of the Wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E503-8.
23. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, et al. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 2008; 57: 509-13.

24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-19.
25. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes Care* 2010; 33(Suppl. 1): S11-61.
26. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-21.
27. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
28. Tan X, Wang X, Chu H, Liu H, Yi X, Xiao Y. SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 81: 363-9.
29. Finucane FM, Luan J, Wareham NJ, Sharp SJ, O'Rahilly S, Balkau B, Flyvbjerg A, et al. Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* 2009; 52: 2345-9.
30. Rebuffat SA, Oliveira JM, Altirriba J, Palau N, Garcia A, Esteban Y, Nadal B, et al. Downregulation of Sfrp5 promotes beta cell proliferation during obesity in the rat. *Diabetologia* 2013; 56: 2446-55.
31. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, Makhlof H, Younoszai Z, Agrawal R, Goodman Z. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatol Baltim Md* 2011; 53: 1874-82.
32. Park JR, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2008; 41: 859-74.